

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Philipps-Universität Marburg
Chirurgisches Forschungslabor
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss von BMP-7 auf Wachstum und Interaktion
von Osteoblasten, Fibroblasten und Sehnen**

Eine in-vitro-Langzeitstudie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marius Ambrock

aus Attendorn

Marburg 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 07.11.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas M. Frangen

1. Korreferent: Prof. Dr. sc. hum. Ralf Kinscherf

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet

1. Einleitung	9
1.1. Verletzungen des vorderen Kreuzbandes (VKB)	9
1.1.1. Epidemiologie	9
1.1.2. Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes	10
1.1.3. Der Unfallmechanismus bei einer VKB-Ruptur	11
1.1.4. VKB-Ersatz/OP-Technik	13
1.1.5. Problematik der VKB-Plastik	15
1.1.6. Möglichkeit eines positiven Einflusses von BMP-7	18
1.2. Bone Morphogenetic Proteins/BMP	19
1.2.1. TGF- β -Superfamilie	19
1.2.2. BMP-Subfamilie	19
1.2.3. BMP-Rezeptoren	20
1.2.4. BMP-Signalkaskade/Smad-Signaltransduktion	21
1.2.4.1. Smad-Proteine	21
1.2.4.2. Smad-Signaltransduktion	22
1.2.4.3. Inhibierung der Smad-Signaltransduktion durch I-Smads	23
1.2.4.4. Durch Smad aktivierte Zielgene	24
1.2.4.5. BMP-Zielgene	24
1.2.4.6. BMP-Zielgene in Osteoblasten	25
1.2.4.7. Regulation der intrazellulären BMP-Signalkaskade	25
1.2.4.8. BMP-Antagonisten	26
1.2.5. BMP-7	29
1.3. Zellarten die bei der Knochen-Sehnen-Interaktion, der VKB -Plastik und im in-vitro Versuch beteiligt sind	30
1.3.1. Osteoblasten	30
1.3.2. Fibroblasten	32
1.3.3. Sehnen/Bänder	33

1.4. Grundüberlegung und allgemeine Fragestellung	34
2. Material	35
2.1. Laborgeräte und Instrumente	35
2.2. Chemikalien	35
2.3. Puffer	38
2.4. Kulturmedium	39
2.5. Test-Kits	39
2.6. Verbrauchsmaterialien	40
3. Methoden	41
3.1. Versuchsbeschreibung	41
3.1.1. Hauptversuch	41
3.1.2. Zusatzversuch	42
3.2. Präparation von Periost zur Gewinnung von POB	44
3.3. Präparation von bovinen Sehnen und Gewinnung von FB	45
3.4. Arbeitsschritte und Abläufe im Hauptversuch	46
3.4.1. Zellzählung von POB und deren Aussaat	46
3.4.2. Fibrinfixierung boviner Sehnen	48
3.4.3. Zellkulturbedingungen	49
3.4.4. Versorgung der Zellkultur	49
3.4.5. Analyt- bzw. Probengewinnung	49
3.4.6. Zell-Lyse zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase	49
3.5. Arbeitsschritte und Abläufe im Zusatzversuch	50
3.5.1. Zellzählung von POB, FB und Mischkultur und deren Aussaat	50
3.5.2. Zellkulturbedingungen	50
3.5.3. Versorgung der Zellkultur	51
3.5.4. Analyt- bzw. Probengewinnung	51
3.5.5. Zelllyse zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase	51

3.6. Histologie	52
3.6.1. Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen	52
3.6.2. Einbettung der Sehnen	52
3.6.3. Herstellung von histologischen Schnitten	53
3.6.4. Die v. Kossa-Färbung	53
3.6.5. Die PAS-Alcianblau-Färbung	53
3.7. Rasterelektronenmikroskopie	54
3.7.1. Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen	54
3.7.2. Critical point Kammer und Sputter coater	54
3.8. Analytbestimmung aus dem Haupt- und Zusatzversuch	55
3.8.1. Bestimmung von AP, Lactat, LDH und OCN mittels ELISA-Assays	55
3.9. Fotodokumentation	57
3.10. Statistik	58
4. Ergebnisse	59
4.1. Ergebnisse des Hauptversuchs aus den Mediumüberständen	59
4.1.1. Ergebnisse aus der Bestimmung der AP	59
4.1.2. Ergebnisse aus der Bestimmung von Lactat und LDH	62
4.1.3. Ergebnisse aus der Bestimmung von OCN	66
4.2. Ergebnisse des Hauptversuchs aus der Zell-Lyse	70
4.2.1. Ergebnisse aus der Bestimmung der AP	70
4.3. Ergebnisse des Zusatzversuches aus den Mediumüberständen	72
4.3.1. Ergebnisse aus der Bestimmung der AP	72
4.3.2. Ergebnisse aus der Bestimmung von Lactat	75
4.3.3. Ergebnisse aus der Bestimmung von LDH	77
4.4. Ergebnisse der AP Bestimmung des Zusatzversuches aus der Zell-Lyse	79
4.5. Ergebnisse aus der Histologie	82
4.5.1. Ergebnisse der Färbungen im Gruppenüberblick	82
4.5.2. Färbeergebnisse aus der Gruppe 1	85
4.5.3. Färbeergebnisse aus der Gruppe 2	88
4.5.4. Färbeergebnisse aus der Gruppe 3	91

Inhaltsverzeichnis	Seite
4.5.5. Färbeergergebnisse aus der Gruppe 4	94
4.5.6. Allgemeine Aspekte der Färbeergergebnisse	96
4.6. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie	97
4.7. Ergebnisse der Fotodokumentation	101
5. Diskussion	103
5.1. Allgemeine Beobachtungen	104
5.2. Diskussion der Ergebnisse des Hauptversuches	105
5.2.1. Vergleich der Analytergebnisse aus den MÜ der einzelnen Gruppen	105
5.2.2. Vergleich der Analytergebnisse aus der Zell-Lyse der einzelnen Gruppen	107
5.2.3. Vergleich der Analytergebnisse aus den MÜ und der Zell-Lyse	108
5.2.4. Vergleich der Färbeergergebnisse der einzelnen Gruppen	108
5.2.5. Vergleich der Färbeergergebnisse in Bezug auf die Analytergebnisse	110
5.2.6. Vergleich der REM-Ergebnisse der einzelnen Gruppen	110
5.3. Diskussion der Ergebnisse des Zusatzversuches	111
5.3.1. Vergleich der Analytergebnisse aus der Zell-Lyse der einzelnen Gruppen	111
5.3.2. Vergleich der Analytergebnisse aus den MÜ der einzelnen Gruppen	112
5.3.3. Vergleich der Analytergebnisse aus der Zell-Lyse und den MÜ	114
5.4. Positive Effekte einer BMP-7 Applikation	114
5.5. Mögliche negative und hemmende Effekte einer BMP-7 Applikation	116
5.6. Mögliche Störeffekte mit Einfluss auf das Kulturwachstum	117
6. Mögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die VKB-Chirurgie und Schlussfolgerungen	118
7. Zusammenfassung	120
8. Ausblick	121
9. Abstract	122

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
10. Abkürzungsverzeichnis	124
11. Abbildungsverzeichnis	125
12. Literaturverzeichnis	127
13. Statistische Tabellen	137
Anhang	
Verzeichnis der akademischen Lehre	143
Danksagung	144

1. Einleitung

1.1. Verletzungen des vorderen Kreuzbandes (VKBs)

1.1.1. Epidemiologie

Die Verletzungen des Kniebandapparates sind häufige Erscheinungen, die mitunter nicht nur im Zusammenhang mit Hochleistungssport auftreten, sondern ebenso im Freizeitsport ihre Ursachen haben und zudem, je nach Verletzungstyp, langwierige Rehabilitationsmaßnahmen nach sich ziehen. Anteilig an allen klinisch relevanten Knieverletzungen liegen Verletzungen des Kniebandapparates bei 40 %. Fast die Hälfte sind hierbei Verletzungen des VKBs mit einem Anteil von 46 % (siehe Abb. 1-3)⁽⁶⁴⁾.

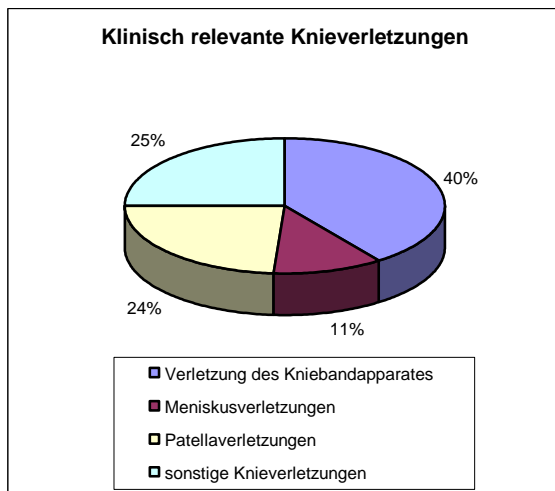


Abb. 1: aus ⁽⁴⁾

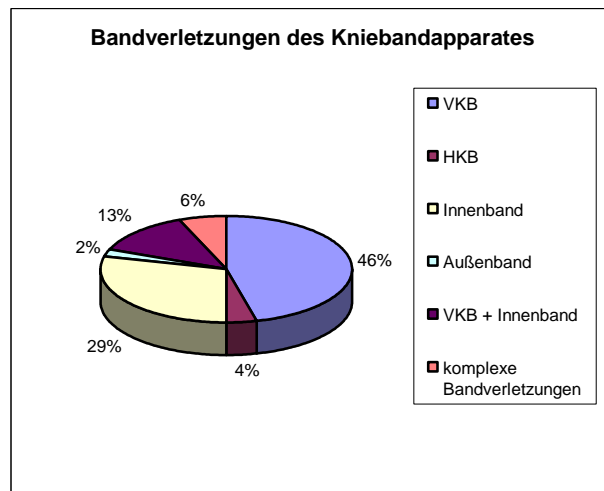


Abb. 2: aus ⁽⁴⁾

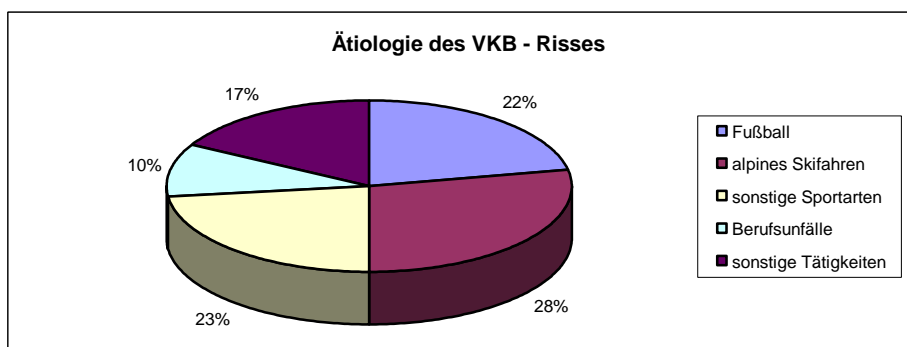


Abb. 3: aus „Gesundheitsdirektion Kanton Zürich, Bericht vom 30.06.2009, Ruptur des VKB“

Das VKB reißt, im Vergleich zum hinteren Kreuzband, zehnmal so häufig, was zum einen an den unterschiedlichen Durchmessern und der damit höheren Belastungsfähigkeit liegt und zum anderen mit der unterschiedlichen Funktion der beiden Bänder zu erklären ist⁽⁹²⁾.

Die Häufigkeit beträgt etwa 0,5 bis 1 VKB-Risse pro 1000 Einwohner (USA, Mitteleuropa)⁽⁴²⁾, die Inzidenz ist dabei zwischen dem 15. und 25. LJ am höchsten⁽²⁹⁾.

2002 betrugen in Deutschland die Kosten der Krankenhäuser für die Therapie der Binnenschädigung des Kniegelenks, bei der die VKB-Ruptur den Hauptanteil darstellte, 359,3 Millionen €^{(28),(83)}. In der Schweiz betragen die jährlichen Kosten ca. 200 bis 250 Millionen Franken, wobei aber 40 % dieser Summe auf Heilkosten, 47 % auf Tagegelder, 12 % auf die Invalidenrente und 2 % auf Kapitalleistungen entfallen⁽¹¹²⁾. Diese Statistiken belegen, dass, neben der langen Rehabilitationszeit, im Schnitt etwa 4-6 Monate postoperativ^{(3),(67)}, und dem damit verbundenen Arbeitsausfall (je nach Arbeitstätigkeit bis zu 6 Monaten⁽⁴⁰⁾, auch der finanzielle Aspekt in der VKB-Chirurgie, insbesondere für das Gesundheitssystem eine immense Rolle spielt. Aber genauso spielen die eben angesprochenen Faktoren auch eine wichtige Rolle für den Patienten als Arbeitnehmer, sowie für den Arbeitgeber.

Daher ist es seit langer Zeit das Anliegen vieler Studien, unter zu Hilfenahme unterschiedlichster Therapieansätze die Behandlungs- und die Regenerationszeit des Patienten zu verringern, um gleichzeitig die Heilung und die Rückkehr ins Berufs- bzw. Sportlerleben zu beschleunigen.

1.1.2. Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes

Das VKB besteht aus straffen, kollagenen Faserzügen, die parallel in Faserbündeln angeordnet und durch Bindegewebe (BG) miteinander verbunden sind. An der Insertionsstelle verändert sich der Faserverlauf in Richtung des Periosts. Die Blutversorgung erfolgt über die A. genus media.

Das VKB ist an den beiden knorpelfreien Kreuzbandhöckern, im vorderen-mittleren Areal des Kniegelenks, am Caput tibiae fixiert, die auch als Eminentia intercondylaris bezeichnet wird. Sein intraartikulärer Verlauf ist von vorne–unten–innen (anterio–caudal–medial) nach hinten–oben–außen (dorso–cranial–lateral) in die Fossa intercondylaris femoris (Abb. 4). Im Zusammenspiel mit dem gesamten Kniebandapparat ist es wichtig für die Stabilität und den Zusammenhalt des Kniegelenks. Insbesondere begrenzt es die Streckung der Tibia und führt das Gelenk während eines Bewegungsablaufes. Die beiden Kreuzbänder zusammen bilden die zentralen, passiven Führungselemente und eine sog. Viergelenkkette, wodurch die Femurkondylen während einer Flexion dazu gezwungen werden, einen Roll-Gleit-Mechanismus durchzuführen, der es letztendlich erlaubt, einen großen Gelenkkopf, wie sie die

Femurkondylen darstellen, auf einer viel kleineren Gelenkpfanne physiologisch zu bewegen. Die Kreuzbänder verhindern insbesondere in Flexionsstellung eine vordere und hintere Verschiebung von Femur und Tibia. Bei Rotationsbewegungen der Tibia nach medial sind die Kreuzbänder gespannt, nach lateral entspannt. Spannung und Entspannung der Kreuzbänder optimieren deren strukturelle Organisation und fördern dabei auch deren Stoffwechsel.

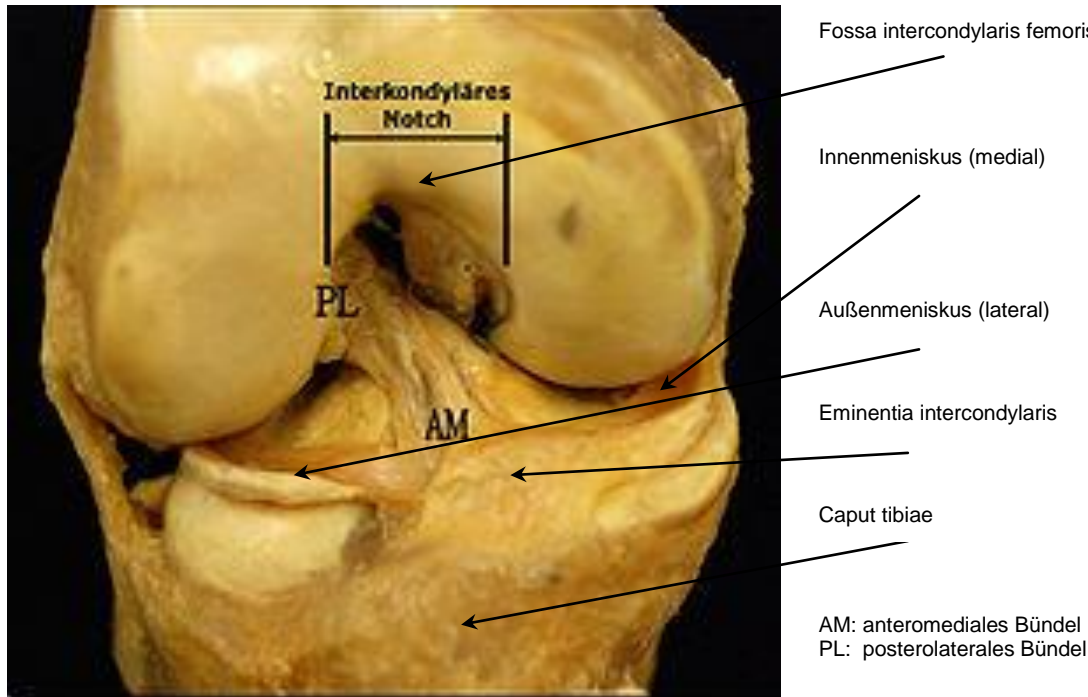


Abb. 4: Anatomie des Kniegelenks aus ⁽⁴⁶⁾

1.1.3. Der Unfallmechanismus bei einer VKB-Ruptur

Am häufigsten entsteht eine Verletzung des VKBs in flektierter und aussenrotierter Knieposition, mit einer äußeren (lateralen) Krafteinwirkung (Valgusstreß)⁽⁹¹⁾. Aber auch bei innenrotiertem und flektiertem Knie, mit innerer (medialen) Krafteinwirkung (Varusstreß), wie z.B. beim Sturz mit überkreuzten Skiern, kommt es zu einer Ruptur. Des Weiteren können auch eine forcierte Innenrotation, eine Hyperextension oder Hyperflexion zu einer Verletzung führen^{(71),(93)}.

Skifahren gehört zu den risikoreichsten Sportarten, die zu einer VKB-Ruptur führen. Des Weiteren treten solche Verletzungen bei sogenannten Stop-and-Go-Sportarten wie Tennis o. Squash auf und bei Mannschaftssportarten, insbesondere bei Fußball, Football, Handball und Basketball. Die Kraft, die bei solchen Stop-and-Go-Sportarten auf das Knie und die Bänder einwirkt, verursacht bei angespannten Bändern geringere Schäden als bei entspannten, lockeren Bändern. Da bei einer erhöhten Belastung der Bänder die Kollagenfaserbündel parallel ausgerichtet und somit elastischer sind, nimmt bei einer stärkeren Anspannung der

Bänder die Steifigkeit zu. Bei einer seitlichen Krafteinwirkung auf das Knie, wird diese auf die Bänder übertragen. Sind diese bereits angespannt, besteht aus den oben genannten Gründen eine hohe Steifigkeit, wodurch die einwirkende Kraft aufgenommen und weitergeleitet wird. Sind die Bänder dagegen entspannt, bei geringer Steifigkeit, bewirkt die plötzlich einschießende Kraft eine ruckartige Anspannung und eine stärkere Kraftübertragung, als bei angespannten Bändern, die letztendlich dazu führen kann, dass die Maximalkraft erreicht wird und es eher zu einer Ruptur kommen kann (siehe auch Abb. 5).

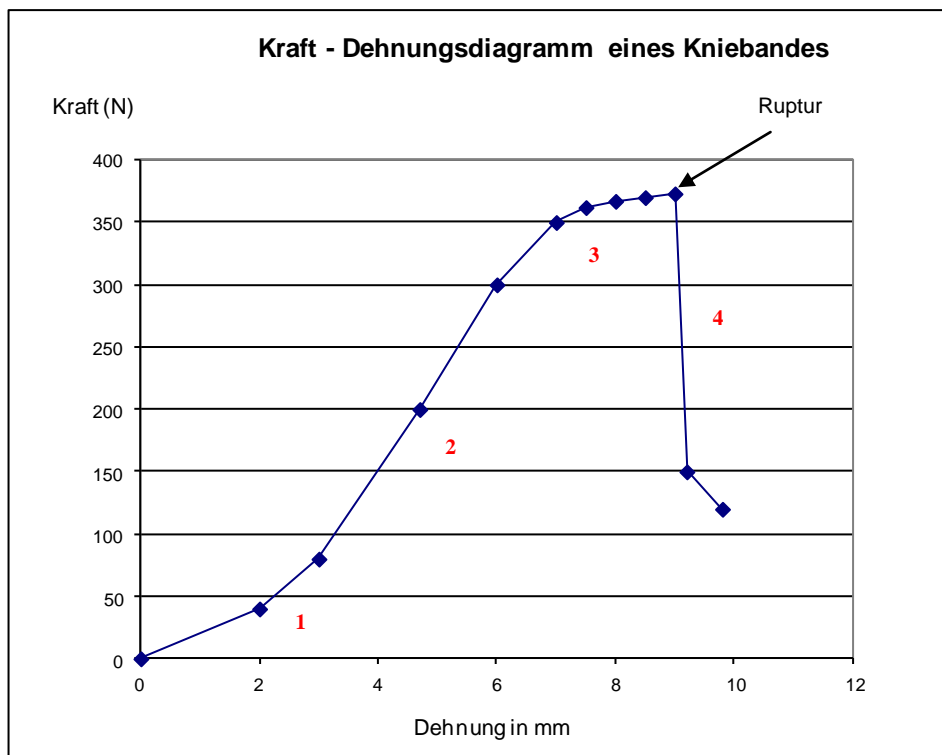


Abb. 5: aus ⁽⁵²⁾

Liegt eine niedrige Belastung (Kraft) des Bandes vor, verläuft die Kurve flach. Da das Band in diesem Zustand mehr gedehnt wird, als bei höherer Belastung, ist die Steifigkeit in diesem Bereich gering ⁽¹⁾.

Bei Kraftzunahme nimmt die Dehnung des Bandes ab und die Steifigkeit zeitgleich zu. Es liegt ein überwiegender linearer Anstieg vor ⁽²⁾.

Aufgrund der parallelen Ausrichtung der Kollagenfaserbündel, ist das Band trotz der zunehmenden Kraft elastisch. Bei weiterer Kraftzunahme kommt es zu irreversiblen Strukturveränderungen des Bandes, so dass eine Relaxation auf die ursprüngliche Länge nicht mehr möglich ist. Steigt die Kraft noch weiter an, zerreißen einzelne Faserbündel, was zu einer Abnahme der Steifigkeit führt, zu erkennen an der Abflachung der Kurve ⁽³⁾.

Dieser Zustand kann noch über eine gewisse Zeit aufrechterhalten werden, bis das Band ab einer bestimmten Maximalkraft plötzlich zerreißt und die Kurve abfällt ⁽⁴⁾⁽¹⁷⁾.

Durch den Riss des Kreuzbandes kommt es zu einer pathologischen Bewegungsfreiheit des Knies, die verschiedene Stabilitätsprobleme mit sich bringt. Zum einen äußert sich der Verlust des VKB in einer sog. anterioren Instabilität, die bedingt durch einen reduzierten Widerstand des Tibiakopfes gegenüber einer anterioren Translation ist und zwischen 0° und 30° Flexion auftritt⁽⁹⁴⁾. Zum anderen kann es auch zu einer Varus- und Valgusinstabilität kommen, die insbesondere in Flexion bei 60° (Varus) und 30° (Valgus) Probleme verursachen kann⁽⁹⁴⁾.

Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die VKB-Ruptur die Gelenkkapsel und Seitenbänder vermehrt in Anspruch genommen werden, um die pathologische Bewegungsfreiheit zu reduzieren und diese dann in einer Überdehnung genannter Strukturen münden. Des Weiteren kann es zum Auftreten eines Pivot-Shift-Phänomens kommen, was auch als giving-way-Phänomen beschrieben wurde und für den Patient nicht nur lästig, sondern auch schmerzhaft sein kann. Hierbei subluxiert bei Streckung des Knies der gesamte Tibiakopf nach ventral, dabei lateral mehr als medial. Bei einer Flexion von 30-40° kommt es dann zu einer spontanen Reposition⁽⁹⁴⁾. Besonders das Pivot-Shift-Phänomen kann dabei zu frühzeitigen degenerativen Veränderungen an Knorpel und Menisken führen⁽⁷²⁾. Diese Veränderungen an Knorpel und insbesondere an Menisken treten jedoch nicht nur als primärer Effekt bei VKB-Rupturen auf⁽⁹⁴⁾, sondern sind sekundär auch die Folge einer chronischen Instabilität^{(11),(19)}.

1.1.4. VKB-Ersatz / OP-Technik

Bei einer Ruptur des VKB ist der Ersatz des rupturierten Kreuzbandes, durch ein Transplantat, die mit am besten geeignete Technik, um Folgeschäden wie Meniskus- oder Knorpelschäden schnellstmöglich anzugehen und diese gegebenenfalls zu verhindern und zeigt signifikante Vorteile gegenüber der konservativen Intervention^{(49),(97)}.

In der VKB-Plastik bzw. dem VKB-Ersatz werden als Transplantat überwiegend körpereigene Sehnen verwendet, sog. autologe Transplantate. Aber auch Transplantate von Leichen (allogenes Transplantat) und von Tieren (xenogenes Transplantat) können in Betracht gezogen werden. Bei autologen Transplantaten kommen neben dem Hamstring-Transplantat (Semitendinosussehne (STS) + ggf. Gracilissehne), dem heutigen Goldstandard⁽⁸⁷⁾, noch die Patella- und die Quadrizepssehne zum Einsatz⁽¹⁴⁾.

Die operative Implantation der STS erfolgt überwiegend arthroskopisch. Primär erfolgt die Gewinnung des Transplantats, welches durch einen ca. 4 cm langen Schnitt auf Höhe des medialen Caput tibiae, mittels eines sog. Sehnenstrippers, knapp unterhalb des Pes Anserinus,

entnommen wird. Die entnommenen Sehnen haben eine Länge von ca. 28 cm. Als nächstes werden die Sehnen in einem Sehnenspanner vorgespannt und das Transplantat drei- bis vierfach mit einer bestimmten Fadentechnik zusammengelegt, fixiert und verdreht (siehe Abb. 6), z.B. als Quadruple. Das Transplantat hat danach eine Länge von ca. 7 cm, bei einem Durchmesser von ca. 7 mm und wird mittels eines nicht resorbierbaren Spezialfadens an den beiden inneren Öffnungen eines Endobuttons (Vierlochplatte) befestigt.



Abb. 6: Vierfach gefaltetes autologes STS-Transplantat mit Fäden armiert

In einer häufigen Technik zur Befestigung der Sehne im Bohrkanal (und die gängige Technik an der Uniklinik Marburg), erfolgt arthroskopisch die Anlage des Bohrkanals durch Tibia und Femur entsprechend dem anatomischen Verlauf des vorderen Kreuzbandes. Dabei entspricht der Durchmesser des tibialen Bohrkanals dem Durchmesser des Transplantats, während der femurale Bohrkanal sich im Verlauf nach proximal verengt (siehe Abb. 7). Der distale Anteil des femuralen Bohrkanals dient dabei der Aufnahme des Transplantates, während der sich proximal verengende Kanal für den Durchzug der Transplantataufhängung vorgesehen ist. Das Transplantat wird dann durch die angelegten Kanäle mittels zweier Zugfäden nach proximal hindurchgezogen und femoral mittels einer Transfix-Schraube am Femur befestigt. Das distale Ende des sich im tibialen Bohrkanal befindliche Transplantates wird nun vorgespannt und mittels einer Interferenzschraube (Delta-Schraube) fixiert (siehe auch Abb. 8).

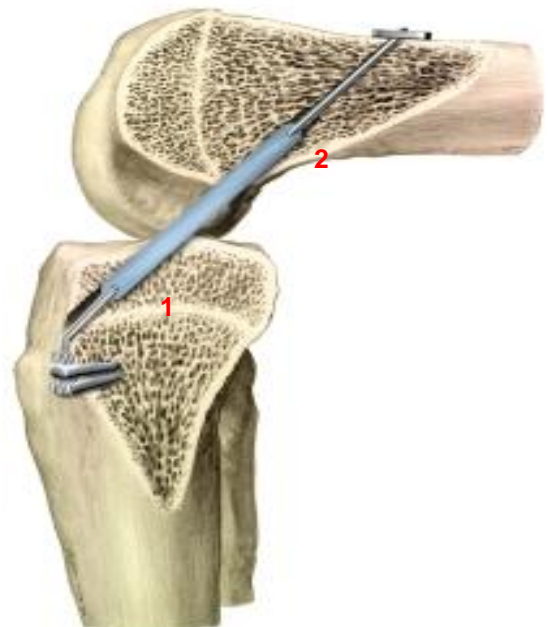


Abb.7: Intraossärer Verlauf eines VKB-Transplantats. Bohrkanal-Verlauf: **1** tibialer Anteil, **2** femuraler Anteil.

aus: www.orthozentrum.ch/huefte-und-Knie/Kreuzbandriss.aspx

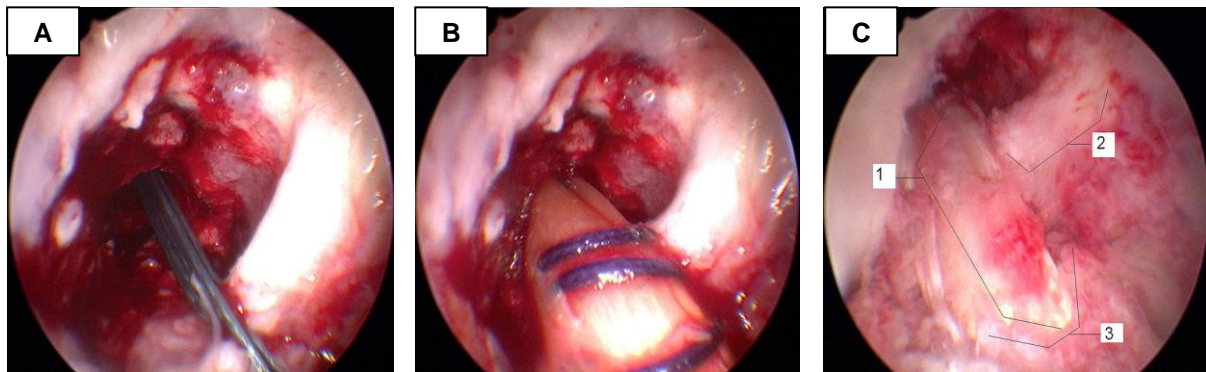


Abb. 8: Intraartikuläre Sicht der Arbeitsschritte während einer VKB-Plastik
 A: Positionierung des femuralen Bohrkanals mit vorgelegtem Durchzugsfaden
 B: Durchzug des Transplantats nach intraartikulär
 C: Position des VKB-Transplantates, Abschlußbild: 1 Transplantat, 2. HKB, 3. VKB-Rest

1.1.5. Problematik der VKB-Plastik

Die knöcherne Integration des VKB-Transplantates in den Bohrkanal nach einer VKB-Plastik ist immer noch ein komplexer, kaum verstandener biologischer Prozess, der durch verschiedene operationstechnische und postoperative Variablen beeinflusst wird. So spielen neben der Wahl des Transplantats auch die Methode der Fixierung, die Positionierung des Bohrkanals in Bezug auf die korrekte anatomischen Lage und die Platzierung des Transplantats im Bohrkanal eine entscheidende Rolle. Trotz dieser vielen Variablen, die ein Scheitern einer VKB-Plastik nach sich ziehen können, ist die Rekonstruktion des VKB mit intraartikulären autologen VKB-Sehnenerersatz die meist akzeptierteste Therapie für junge und aktive Patienten⁽²⁰⁾. Die VKB-Plastik hat zudem gezeigt, dass sie die klinische Instabilität des Knies verbessert und somit auch das Risiko von Meniskusschäden und dadurch sekundär bedingter Gonarthrose senkt sowie auch die Rate an Folgeoperationen vermindert^{(20),(82)}.

Eines der Hauptprobleme liegt aber trotz allem im Einwachsverhalten des Transplantates in den Bohrkanal. Ein schlechtes Einwachsen bedeutet hierbei ein mögliches Transplantatversagen. Ursachen dafür sind u.a. chirurgische Fehler (falsche Platzierung des Bohrkanals), ein biologisches Versagen (durch fehlendes Einheilen) und eine erneute Kreuzbandruptur (z.B. durch zu schnelle postoperative Belastung). Laut einer US-amerikanischen Studie von 2004, war die Ursache bei Transplantatversagen in 52% der Fälle iatrogen, zu 25% bedingt durch ein Re-Ruptur, bei 8% ein mangelhaftes Einwachsen, bei 3% eine Bewegungseinschränkung und bei weiteren 3% die verwendeten synthetischen Implantate Ursache für das Versagen. Bei 9% konnte keine genaue Ursache zugeordnet werden⁽⁶⁾. Mit 52% sind die chirurgischen Ursachen für ein Transplantatversagen die größte

Gruppe. Typische chirurgische Fehler sind u.a. die falsche Platzierung des Bohrkanals, eine ungenügende Fixierung und Spannung des Transplantates sowie eine unzureichende Notch-Plastik⁽¹⁸⁾. Die zweite große Gruppe der Transplantatversager, sind die Re-Rupturen, die durch eine zu starke Rehabilitation, zu frühe Aufnahme sportlicher Tätigkeit oder mangelnde Compliance bedingt sein können⁽⁷⁶⁾.

Neben diesen ersten beiden großen Gruppen, erscheint die Gruppe der Transplantatversager durch ein mangelhaftes Einwachsen des Transplantates eher gering, sie ist aber nicht minder wichtig. Da die Ursachen in den beiden ersten Gruppen sich eher auf menschliche Qualitäten beziehen, ist es wichtig zu verstehen, welche Abläufe, eine korrekte Platzierung vorausgesetzt, nach einer Implantierung der Sehne im Bohrkanal stattfinden, um ggf. hier eine weitere Therapie-Option zur Reduzierung der Transplantatversager zu entwickeln.

Heilungsprozess des Transplantats nach einer VKB-Plastik

In der Frühphase nach Ersatz des VKBs, meist ab dem 4. Tag, kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion, die die Migration von neutrophilen Granulocyten (Gc), vergrößerten Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen in den Bereich der Knochen-Sehnen-Grenzfläche nach sich zieht^{(16),(48)}. Diese Zellen sind es auch, die das Transplantat besiedeln und mit ihren Zytokinen (u.a. auch TGF- β) die Bildung eines granulofibrösen Narbengewebes, zwischen Transplantat und Knochen, bewirken. Frühestens nach 2 Wochen kommt es durch die Präsenz dieses Narbengewebes in der Grenzfläche, zwischen Knochen und Sehne, zu einer Produktion von Kollagenfasern (insbesondere Kollagen Typ II und III)^{(16),(48)}. Zudem können in dem Granulationsgewebe VEGF und b-FGF nachgewiesen werden⁽³⁶⁾. Nach 6 Wochen ist das Transplantat komplett von einer vaskularisierten synovialen Hülle überzogen und ab der 20. Woche ist die intrinsische Vaskularisierung des Transplantats abgeschlossen⁽¹⁶⁾.

Knorpelartige Zellen wachsen aus den Rändern des Bohrkanals in diesen ein und bauen das fibrovaskuläre Granulationsgewebe in Richtung der Sehne ab und lagern stattdessen Kollagen Typ II in die Matrix ein. Die histologischen Veränderungen in den Seitenwänden des Bohrkanals sind den Prozessen einer enchondralen Ossifikation sehr ähnlich, während die Entwicklung im Bohrkanal analog zu den Prozessen ist, die bei einer Frakturheilung stattfinden⁽³⁶⁾.

Der Heilungsprozess wird letztendlich durch das Einwachsen von Knochen in die fibrovaskuläre Grenzfläche, durch sog. Sharpey-like-Fasern, reguliert, was in Tierversuchen schon ab der sechsten bis achten Woche nach der OP beobachtet wurde^{(48),(78)}. Diese Fasern

bestehen aus Kollagen Typ II und III, deren Wachstumsrichtung ist entgegengesetzt der Richtung der Scherspannung^{(36),(51)}. In der Grenzfläche kommt es dann zu einer progressiven Mineralisierung, die äußeren Schichten des Transplantats werden mit Knochen durchzogen und das Transplantat wird allmählich in den es umgebenden Knochen miteinbezogen.

Die Wiederansiedlung von Kollagenfasern zwischen der Sehne und dem Knochen resultieren dann letztendlich in einer Restaurierung der Sehnen-Knochen-Verbindung⁽⁷⁾. Nach 30 Wochen ist der Kollagengehalt vom Typ III des Transplantats mit ca. 10 % ungefähr genauso hoch wie in einem normalen Kreuzband.

Die Veränderungen in der Sehne sind im Vergleich zu den histologischen Veränderungen im Knochen, verspätet, was zu einem Verlust der mechanischen Stärke und Belastung führt⁽³⁶⁾. Zusätzlich ist die Sehne während des Heilungsprozesses verdünnt, was ebenfalls zu einer Verminderung der strukturellen Eigenschaften und Festigkeit und letztendlich zu einem Fehlschlagen des Einwachsens führen kann⁽¹⁶⁾.

Lage und Fixierung im Bohrkanal

Die falsche Positionierung des Bohrkanals ist eine der Hauptursachen für ein Transplantatversagen bei einer VKB-Plastik. Eine anatomisch und isometrisch korrekte Anlage des Bohrkanals ist daher nötig, um eine mechanische Überbelastung des Transplantates zu vermeiden und somit die negativen Effekte auf die knöcherne Integration des Transplantates zu verringern und letztendlich die Knochen-Transplantat-Heilung zu fördern⁽¹⁶⁾. Das Einwachsen des Transplantats im Bohrkanal ist abhängig vom mechanischen Streß, der auf die Sehne ausgeübt wird. Es wurde gezeigt, dass die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen abhängig vom Druck und der Spannung ist, der diese ausgesetzt sind⁽⁷⁾.

Der Anspruch der Patienten, das Knie nach einer OP wieder schnell belasten zu können, setzt, neben den oben beschriebenen Bedingungen, die sichere und verlässliche mechanische Fixierung des Transplantats in der postoperativen Phase voraus. Dies ist die Voraussetzung, die Bewegung der Sehne im Bohrkanal so gering wie möglich zu halten, um ein schnelleres Einwachsen zu gewährleisten. Aus der Literatur ist zudem hinreichend bekannt, dass 6-7 Wochen nach der OP die Steifheit und insbesondere die Reißfestigkeit des Transplantates am niedrigsten sind, was nicht mit der Fixierung, sondern mit dem intrinsischen Umbauprozess des Transplantats zusammenhängt⁽¹⁶⁾.

Transplantatversagen

Nirgendwo in unserem Körper ist eine Sehne so von Knochen umgeben, wie in einem Bohrkanal. Ein fehlgeschlagenes Einwachsen der Sehne ist letztendlich die Ursache für ein Transplantatversagen. Drei grundlegende Faktoren werden für dieses Versagen verantwortlich gemacht: 1. die Präsenz von inflammatorischen Zellen, 2. die Bewegung der Sehne im Bohrkanal und damit die Verschiebung der Grenzfläche zwischen Knochen und Sehne sowie 3. eine Anzahl von insuffizienten Zellen auf der Grenzoberfläche. Diese Faktoren können eine Rolle für das Fehlen von Zell-Zell-Interaktionen und Differenzierungen spielen, welches zu einer insuffizienten Heilung der Knochen-Sehnen-Grenzfläche führt⁽⁷⁾.

1.1.6. Möglichkeit eines positiven Einflusses von Bone Morphogenetic Protein-7

Die Variablen, die ein erfolgreiches und suffizientes Einwachsen des Transplantats beeinflussen und zu einem Transplantatversagen führen können, sind, wie oben beschrieben, groß und lassen sich grob in extrinsische und intrinsische Faktoren einteilen.

Extrinsische Variablen sind durch geübte und erfahrene Chirurgen, was die Positionierung des Bohrkanals in korrekter anatomischer Lage und die Fixation des Transplantats anbelangt, gut kontrollierbar und reproduzierbar. Intrinsische Variablen, wie das Einwachsen der Sehne und der ossäre Integrationsprozess, sind dagegen nach einer OP, unter der Voraussetzung, dass der Bohrkanal richtig liegt und das Transplantat gut fixiert ist, schlecht von außen steuerbar.

Um auf diese Prozesse dennoch Einfluss nehmen zu können, wurde in vielen Studien versucht die knöcherne Sehnenintegration positiv zu beeinflussen. Sei es durch die Applikation von Zytokinen⁽⁷⁾, mit Hydrogel und Fibrin bezogenen Matrices⁽⁷⁾, Periost bezogenen Transplantaten⁽⁷⁾ oder durch Wachstumsfaktoren wie Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) oder Bone-Morphogenetic-Proteins (BMP)^{(43),(57),(101),(105)}.

Insbesondere das BMP-7 mit seinem osteogenetischen Potential gibt, wie schon in vielen Studien unter Beweis gestellt wurde, Anlass zu der Vermutung, dass durch eine Applikation von BMP-7 nicht nur der Heilungsprozess der Sehne im Bohrkanal positiv beeinflusst, sondern auch die Einheilungstendenz bzw. das Einwachsen beschleunigt werden kann.

Zwar haben schon viele klinische und experimentelle Studien den positiven und osteogenetischen Effekt von BMP-7 belegt. Nichts desto trotz sind die Ergebnisse, die dabei erzielt wurden, noch nicht ausreichend genug, um einen klinischen Nutzen eines BMP-7 Präparates in der Praxis der Kreuzbandchirurgie vollends zu dokumentieren, so dass hier in jedem Fall noch Forschungsbedarf existiert.

1.2. Bone Morphogenetic Proteins/BMP

1.2.1. TGF- β -Superfamilie

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) gehören wie auch noch viele andere Wachstumshormone zur TGF- β -Superfamilie, einer Gruppe von Proteinen, die wichtige Aufgaben in der Proliferation und Differenzierung von Zellen innehaben. Zum anderen übernehmen sie fundamentale Rollen in der Entwicklung, beim Wachstum, in der Gewebs-Homeostase und in der Regulation des Immunsystems.

Zur Zeit sind ca. 34 Mitglieder dieser TGF- β Superfamilie bekannt, wie die Activin/Inhibin Subfamilie, die TGF- β Subfamilie, die decapentaplegic-Vg-related (DVR) Subfamilie, sowie nah verwandte Polypeptide wie Nodal und das Anti-Müller-Hormon^{(55),(56)}.

Diese Proteine binden an Serin/Threonin spezifische Protein-Kinasen und lösen über Smad-Proteine eine intrazelluläre Signalkaskade aus.

1.2.2. BMP-Subfamilie

Die Familie der Bone Morphogenetic Proteins wurde 1965 von Marshall Urist das erste Mal registriert⁽⁸⁸⁾ und in den späten 1980er Jahren folgten die ersten spezifischen Klone von Proteinen, die für die beobachteten osteogenetischen Effekte verantwortlich waren⁽⁹⁸⁾. Seitdem erfolgte eine intensive Erforschung der BMP-Gruppen und deren Eigenschaften. Die Bone Morphogenetic Proteins sind eine Untergruppe der TGF- β Superfamilie mit zur Zeit mehr als 20 bekannten Formen von humanen BMPs⁽⁶⁰⁾. Einige von Ihnen besitzen spezifische osteoinductive Fähigkeiten, die insbesondere darin liegen, undifferenzierte mesenchymale Stammzellen zu Chondro- oder Osteoblasten zu differenzieren^{(47),(53),(79)}.

Alle BMPs haben eine ähnliche chemische Struktur, jedoch eine unterschiedliche spezifische Funktion. Zugehörig zu ihrer jeweiligen chemischen Struktur kann man die BMP-Mitglieder in 4 Untergruppen einteilen.

Zur Gruppe 1 zählt man demnach: BMP-2 und BMP-4; Tab.1

zur Gruppe 2: BMP-5, BMP-6 und BMP-7; zur Gruppe 3: GDF-5/BMP-14, GDF-6/BMP-13 und GDF-7/BMP-12; zur Gruppe 4 schließlich: BMP-3/Osteogenin und GDF-10/BMP-3b (siehe hierzu auch Tab.1)^{(55),(75)}.

Untergruppen der BMP-Familie	
Gruppe 1	BMP-2 BMP-4
Gruppe 2	BMP-5 BMP-6 BMP-7
Gruppe 3	GDF-5/BMP-14 GDF-6/BMP-13 GDF-7/BMP-12
Gruppe 4	BMP-3/Osteogenin GDF-10/BMP-3b

Wie die TGF- β Superfamilie vermittelt auch die BMP-Subfamilie die intrazelluläre Signalkaskade über Smad-Proteine. Diese werden über verschiedene BMP-Rezeptoren aktiviert und sorgen intranucleär für die Transkription spezifischer Genabschnitte.

1.2.3. BMP-Rezeptoren

Die BMP-Rezeptoren sind Serin/Threonin Kinasen, die in ihrer Struktur und Funktion eng verwandt mit TGF- β Rezeptoren und Activin Rezeptoren sind ^{(59),(60),(75)} und die man grob in zwei Subtypen unterteilen kann, wobei jeder Subtyp wieder aus mehreren Rezeptortypen besteht.

Die Typ I Rezeptoren besitzen drei Untergruppen:

Typ IA/BMPR-IA (ALK-3), Typ IB/BMPR-IB (ALK-6) und Typ IA Activin Rezeptor/ActRIA (ALK-2).

Die Typ II Rezeptoren besitzen ebenfalls drei Untergruppen:

Typ II/BMPR-II und Typ II und Typ IIB Activin-Rezeptoren/ActRII u. ActRIIB (siehe hierzu Tab. 2) ^{(1),(8),(59),(60)}.

Tab.2

BMP Typ I Rezeptor	
BMPR-IA (ALK-3)	BMP-2 BMP-4
BMPR-IB (ALK-6)	BMP-7 GDF-5
ActRIA (ALK-2)	BMP-2 BMP-7 GDF-5 Activin
BMP Typ II Rezeptor	
BMPR-II	BMP-2 BMP-4 BMP-7 GDF-5
ActRIIA	BMP-2 BMP-7
ActRIIB	GDF-5 Activin

Diese Rezeptortypen sind in verschiedenen Gewebearten vorhanden, aber die Expressierung in der Zellmembran variiert zwischen den unterschiedlichen Zelltypen ⁽⁵⁵⁾. Zudem sind die Bindungsaffinitäten der BMPs zu den beiden Subtypen, Typ I und Typ II, unterschiedlich hoch. Typ II Rezeptoren sind allem Anschein nach für BMPs spezifischer und erhöhen gleichzeitig die Bindungsaffinität der BMPs ^{(50),(73)}. Zudem können Typ I Rezeptoren BMP besser in der Anwesenheit von Typ II Rezeptoren binden, während Typ II Rezeptoren nicht auf die Expressierung von Typ I Rezeptoren angewiesen sind ⁽⁸⁾.

Kommt es zu einer Liganden-Bindung (Bindung von BMP), bilden beide Rezeptortypen einen heterotetrameren aktivierten Rezeptorkomplex, bestehend aus zwei Paaren Typ I und zwei Paaren Typ II Rezeptoren ^{(5),(59),(63),(75)}. Durch diese Oligomerisation wird eine Signalkaskade aktiviert, die durch mehrere Phosphorylierungsschritte von sogenannten Smad-Proteinen dafür sorgt, dass im Zellkern bestimmte Zielgene aktiviert werden ^{(8),(55),(75)}.

1.2.4. BMP-Signalkaskade/Smad-Signaltransduktion

Bindet ein BMP an den jeweiligen Rezeptor, wird intrazellulär eine Signalkaskade ausgelöst, die für die Übermittlung der Informationen sogenannte Smad-Proteine verwenden, welche die Hauptübertragungswege der BMP-Signalkaskade darstellen und einen komplizierten Mechanismus von Aktivierungsschritten und negativen Rückkopplungsmechanismen in Gang setzen.

1.2.4.1. Smad-Proteine

Zurzeit sind 8 Smad-Proteine bekannt, die in unterschiedlichen Gruppen nach ihrer Funktion zusammengefasst sind. Smad1, Smad5 und Smad8 werden ausschließlich von BMP Typ I Rezeptoren phosphoryliert, was Ihnen auch den Namen R-Smad (receptor regulated Smad) bzw. BR-Smad eingebracht hat. Smad2 und Smad3 werden dagegen von Activin- und TGF- β Typ I Rezeptor aktiviert. Auch diese werden als R-Smad bezeichnet.

Diese Gruppe von R-Smads gehen im weiteren Verlauf Komplexe mit sogenannten Co-Smads ein, die im Zellkern an entsprechende Zielgene binden. Smad4 ist das einzige Co-Smad, das sowohl über den BMP als auch über den TGF- β /Activin Signalweg läuft.

Die dritte Gruppe von Smad-Proteinen sind die sogenannten inhibitory Smads (I-Smad), die im Sinne einer negativen Rückkopplung die Funktion von R-Smad und Co-Smad hemmen. Zu diesen I-Smads gehören Smad6 und Smad7^{(56),(59),(60),(75)}.

Struktur

Die Smad-Proteine besitzen wie alle Proteine sog. N- und C-terminale Enden, die als MH1 und MH2 bezeichnet werden. MH2 Enden sind in allen drei Smad-Gruppen vorhanden und besitzen bei den R-Smads ein charakteristisches Ser-Ser-X-Ser (SSXS) Motiv, welches durch die Typ I Rezeptoren phosphoryliert wird. Die MH1 Enden sind im Gegensatz nur in R-Smads und Co-Smads vorhanden. (siehe Abb. 9 A) Sind die BMP-Rezeptoren inaktiv oder nicht exprimiert, binden sich die MH1 und MH2 Domänen der R-Smads und hemmen sich so gegenseitig in Ihren Funktionen. Wird die MH2 Domäne mit Ihrem SSXS Motiv bei Beginn der Signalkaskade phosphoryliert, werden die zuvor inaktivierten R-Smads aktiviert und formen einen oligomeren Komplex. Die MH2 Domäne ist verantwortlich für die Interaktion mit Rezeptoren und verschiedenen DNA-bindenden Proteinen, die Oligomer-Bildung mit anderen Smad-Proteinen und den Start von Transkriptionsprozessen.

Die MH1 Domäne ist für die Bindung von Smad-Proteinen an der DNA verantwortlich sowie für die nukleäre Translokation von MH2 Domänen und die Funktionshemmung der MH2 Domänen wichtig. Zudem sorgt sie ebenso wie die MH2 Domänen für die Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen⁽⁵⁹⁾.

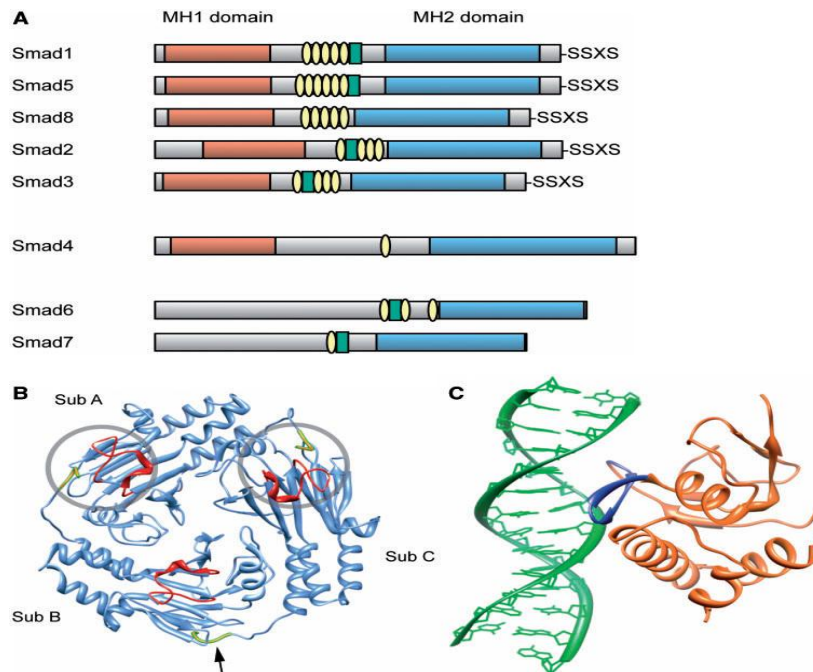


Abb. 9: aus ⁽⁵⁹⁾

A: Darstellung der unterschiedlichen Zusammensetzung der Smad-Proteine. **B:** Homotrimer eines Smad1-Proteins durch Bindung der drei MH2-Untereinheiten. **C:** Bindung eines Smad3-Proteins an die DNA.

1.2.4.2. Smad-Signaltransduktion

Die BMP Typ II Rezeptor Kinase transphosphoryliert nach der Bindung von BMP die G_s Domäne des BMP Typ I Rezeptors, die so zu einer Aktivierung der Typ I Rezeptor Kinase führt. In diesem Zusammenspiel agiert der Typ II Rezeptor als eine primäre Bindungsstelle für die Liganden, während der Typ I Rezeptor als ein Effektor in der Signaltransduktion wirkt⁽⁸⁾. Die aktivierte Typ I Rezeptor Kinase phosphoryliert nun Smad1 oder Smad5, die wiederum nur in einem phosphorylierten Zustand einen heterodimeren Komplex mit Smad 4 eingehen können. Dieser Komplex aus Smad 1/Smad4 oder Smad5/Smad4 transloziert in den Zellkern und interagiert dort mit spezifischen DNA-bindenden Proteinen,

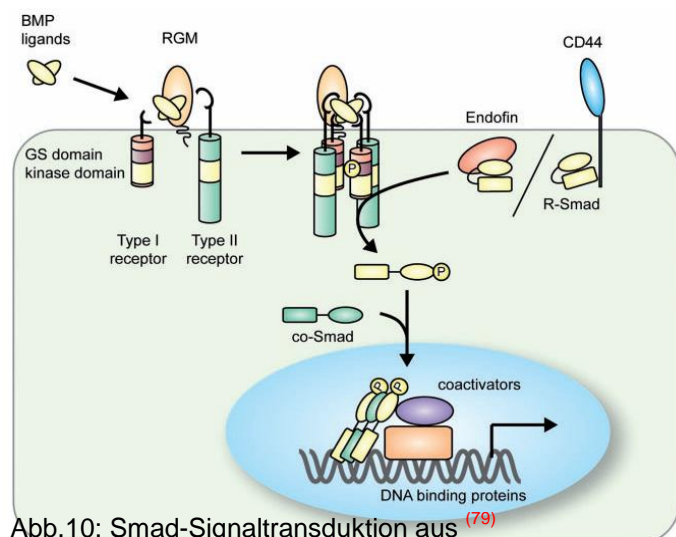


Abb.10: Smad-Signaltransduktion aus ⁽⁷⁹⁾

transloziert in den Zellkern und interagiert dort mit spezifischen DNA-bindenden Proteinen,

die zu einer Transkription von bestimmten Zielgenen führen (s. Abb. 10). Smad1 als Beispiel bindet an den Transkriptionsfaktor Hoxc-8, welcher ein Repressor für die Osteopontin Gen-Transkription ist. Durch die Bindung von Smad 1 an diesen Transkriptionsfaktor, verliert dieser seine hemmende Funktion und es kommt zur Osteopontin Gen-Transkription⁽⁸⁾.

1.2.4.3. Inhibierung der Smad-Signaltransduktion

I-Smads interagieren mit, durch Typ II Rezeptoren aktivierte, Typ I Rezeptoren und binden mit den MH2 Domänen direkt an den Rezeptor, wodurch die Phosphorylierung von R-Smad unterbunden wird^{(59),(60)}. Zudem interagieren I-Smads direkt mit aktivierten R-Smads und verhindern so die Komplex-Bildung mit Co-Smad^{(59),(60)}. Aber auch intranucleär werden I-Smads aktiv, indem sie durch Hemmung des Smad-DNA-Komplexes die Transkription verschiedener Gene verhindern (siehe hierzu auch Abb. 11)^{(59),(60)}.

Abb. 11: Inhibierung der Smad-Signaltransduktion aus⁽⁷⁹⁾

1.2.4.4. Durch Smad aktivierte Zielgene

Auf der DNA befinden sich für einige Smad-Proteine direkte Bindungssequenzen. Für die BR-Smads sind AGAC/GTCT- und GCCnCGC spezifische Basensequenzen von Zielgenen, die direkt zu einer Transkription dieser Bereiche führen. Zum anderen binden Smad-Proteine an verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF).

Runx

Dies ist eine Familie von TF, die verschiedene biologische Eigenschaften übernehmen, wie z.B. die Knochenbildung. BR-Smads interagieren nach Ihrer Aktivierung mit Runx2 und lösen so direkt eine Transkription von Zielgenen aus, die für die Osteoblasten-Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen verantwortlich sind^{(32),(86)}. Aber auch indirekt, über eine BMP gesteuerte Aktivierung von Dlx5 in Osteoblasten, wird in Osteoblasten-Vorläuferzellen der TF Runx2 aktiviert (siehe auch Abb. 12)⁽⁵⁸⁾.

Menin

Dieser TF wird benötigt, um mesenchymale Stammzellen sich zu differenzierten Osteoblasten entwickeln zu lassen. Menin interagiert ebenfalls mit BR-Smad und Runx2 in mesenchymalen Stammzellen und fördert die Transkription bestimmter Gene in der frühen Differenzierungsphase von Osteoblasten. Zum anderen bildet Menin mit Smad3 einen Komplex, der in der späten Differenzierungsphase der OB zu einer Hemmung der BR-Smad/Runx2 induzierten Transkription führt⁽⁸¹⁾.

p300 und CBP

Diese beiden Co-TF interagieren mit verschiedenen R-Smads und führen so zu einer Verstärkung der Smad abhängigen Transkription von Zielgenen⁽⁶²⁾. p300 als Beispiel interagiert u.a. mit Runx3 und verstärkt die Runx3 abhängige Transkription (siehe hierzu auch Abb.15)⁽³⁴⁾.

1.2.4.5. BMP-Zielgene

Unter den verschiedenen schon eben beschriebenen Zielgenen, die über BMP abhängige Kaskaden durch BR-Smad-Proteine aktiviert werden, stellen die Id Proteine (inhibitor of differentiation) die wichtigste Gruppe von BMP-Zielgenen dar^{(59),(60),(61),(103)}. Sie haben neben dem negativen (inhibitorischen) regulierenden Effekt auf die Zelldifferenzierung auch einen positiven (verstärkenden) regulierenden Effekt auf die Zellproliferation.

1.2.4.6. BMP-Zielgene in Osteoblasten

Im Laufe der Forschung und durch die Entwicklung der DNA-Microarray Analyse wurden immer mehr BMP-Zielgene identifiziert. De Jong et al identifizierte 184 BMP abhängige Gene in C2C12 Zellen. Diese kann man nach Ihrer Aktivierung in früh aktivierte (2 h nach BMP-Stimulation), intermediate (6h nach BMP-Stimulation) und spät aktivierte Gene (24 h nach BMP-Stimulation) unterscheiden.

Zu den früh aktivierten Genen gehören u.a.: Id1-3, Smad6, Smad7, OASIS, Prx2, TIEG, Runx2, Osterix und Snail. Die intermediate und spät aktivierten Gene sind wichtig für die OB Differenzierung, zu Ihnen gehören u.a.: Hey 1, Tcf7, ITF-2, Pitx2 und ICSBP^{(59,(60))}.

1.2.4.7. Regulation der intrazellulären BMP-Signalkaskade

Um die BMP Wirkung intrazellulär zu verstärken oder zu hemmen, greift die Zelle auf eine Reihe von Rückkopplungsmechanismen zurück. Der mitunter wichtigste Regulationsmechanismus liegt in der Funktion der I-Smads, die im Abschnitt 1.2.4.3. erläutert wurden. Aber noch andere Mechanismen, die z.T. in der Interaktion mit R-Smad und I-Smad Proteinen stehen, sollen hier kurz erläutert werden.

Smurf

Diese Proteine stehen in engem Zusammenhang mit der Regulation und dem Abbau von R-Smad-Proteinen. Sie kontrollieren sozusagen den R-Smad-Haushalt in der Zelle, interagieren aber auch zusätzlich mit I-Smads, indem sie den Export von I-Smad aus dem Zellkern anregen^{(15),(60),(106)}.

Smurf1 z.B. interagiert direkt mit Runx2 und sorgt für dessen Abbau, so dass hierdurch die Aktivität der AP und Produktion von OCN in Osteoprogenitor-Zellen herabgesetzt wird⁽¹⁰⁷⁾.

Arkadia und Jab1/GCN5

Arkadia ist ein Protein, das für den Ubiquitin abhängigen Abbau von Smad7 sorgt, was dadurch zu einer Verstärkung der BMP- und TGF- β -Signalkaskade führt⁽⁴⁴⁾. Jab1/GCN5 ist ein Proteinkomplex, der mit Smad7 interagiert und dessen Loslösung vom Zellkern bewirkt. Daraufhin wird Smad7 im Cytoplasma über Proteasomen abgebaut und die Signalwirkung dadurch verstärkt⁽³⁹⁾.

AMSH

Ein cytoplasmatisches Protein, das ausschließlich an Smad6 bindet. Hierdurch verhindert es die Interaktion von Smad6 mit BMP Typ I Rezeptor und Smad1 und hebt so die inhibitorischen Effekte von Smad6 auf⁽³³⁾. Wenn die BMP Typ I Rezeptoren aktiviert werden, phosphoryliert eine JNK u./o. eine p38 MAP-Kinase AMSH. In diesem Zustand wird der antagonisierende Effekt auf Smad6 aufgehoben.

Tob

Ist ein Mitglied der antiproliferativen Genfamilie, das in OB mit BR-Smad-Proteinen interagiert und so die BMP Signale über eine Transkriptionshemmung inhibiert (Abb. 12).

Zudem kann Tob auch direkt aktivierte BMP Typ I Rezeptoren hemmen und wird dadurch als ein Partner der I-Smad-Proteine betrachtet^{(5),(60),(104)}.

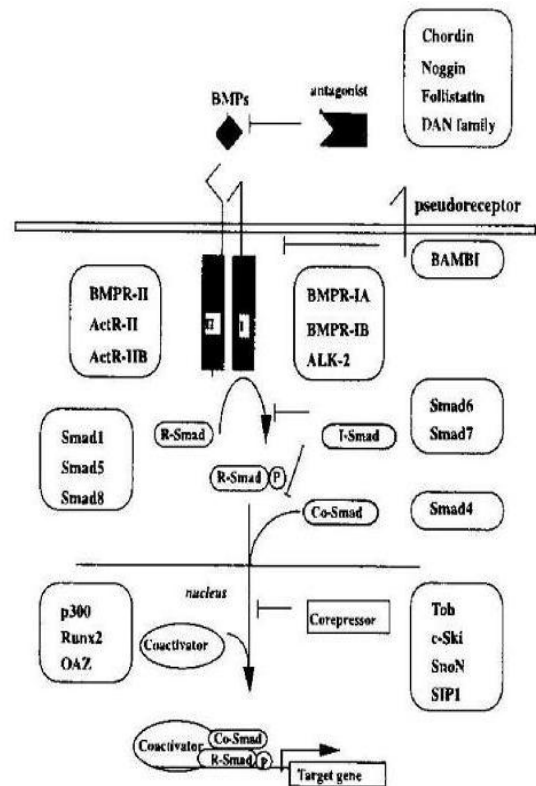


Abb. 12: BMP-Signalkaskaden Regulation aus⁽¹⁰⁴⁾

Cdk6

Dieses Protein ist in der Lage, die BMP induzierte OB-Differenzierung zu unterbinden, ohne dabei jedoch die Proliferation zu beeinflussen⁽⁶⁵⁾.

SANE

SANE bindet an BR-Smad-Proteine und BMP Typ I Rezeptoren und blockiert auf diese Weise insbesondere die BMP abhängige Signalkaskade⁽⁷⁰⁾.

CIZ

Ein Zinkfinger Protein, welches BMP vermittelte BR-Smad-Transkription antagonisiert und somit zu einer verminderten Expression von AP, OCN, Kollagen Typ I und Runx2 führt⁽⁸⁰⁾.

1.2.4.8. BMP-Antagonisten

Die Antagonisten von BMP werden allgemein in drei Gruppen eingeteilt^{(1),(25)}:

1. Extrazellulär wirkende Antagonisten, die von der Zielzelle sezerniert werden und direkt an ihre Ziele binden. 2. Transmembran Proteine, wie z.B. BAMBI, die als dominante Pseudorezeptoren mit BMP Typ II Rezeptoren interagieren und so die intrazelluläre

Signalkaskade hemmen und 3. Intrazelluläre negative Modulatoren der BMP vermittelten Signalkaskade, wie z.B. die I-Smads, Ubiquitinierungen und proteasomaler Abbau.

Extrazelluläre BMP-Antagonisten

Dies ist eine Gruppe von Glykoproteinen mit einer charakteristischen Cystein-Bindungsstelle. Man unterteilt diese in vier Untergruppen: die Dan-, twisted gastrulation-, Chordin- und Noggin-Familie^{(1),(25)}.

Noggin-Familie

Diese Klasse von Antagonisten ist die am besten erforschte unter den BMP-Antagonisten. Noggin besitzt eine Größe von 64 kDa und bindet mit unterschiedlicher Affinität an BMP-2, -4, -5, -6, und -7, als auch an GDF-5 u. -6. Bei der Bindung mit BMP-7 wurde gezeigt, dass Noggin die Verbindungsstellen der bindenden Epitope für BMP Typ I und II Rezeptoren blockiert und so die BMP-7 vermittelte Signalkaskade hemmt (Abb. 14)^{(25),(31)}.

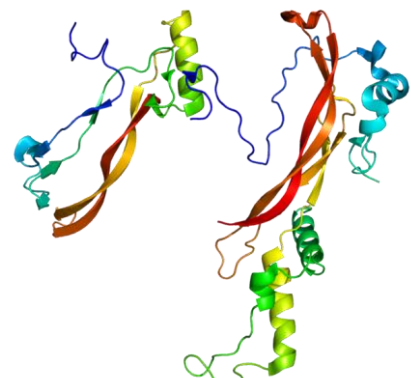


Abb. 13: 3-D Modell v. Noggin

Noggin hemmt in vitro, bei einer vermehrten Expression, die Differenzierung von KM-Stammzellen in aktive OB und mindert die Funktion von bereits differenzierten OB^{(27),(110)}.

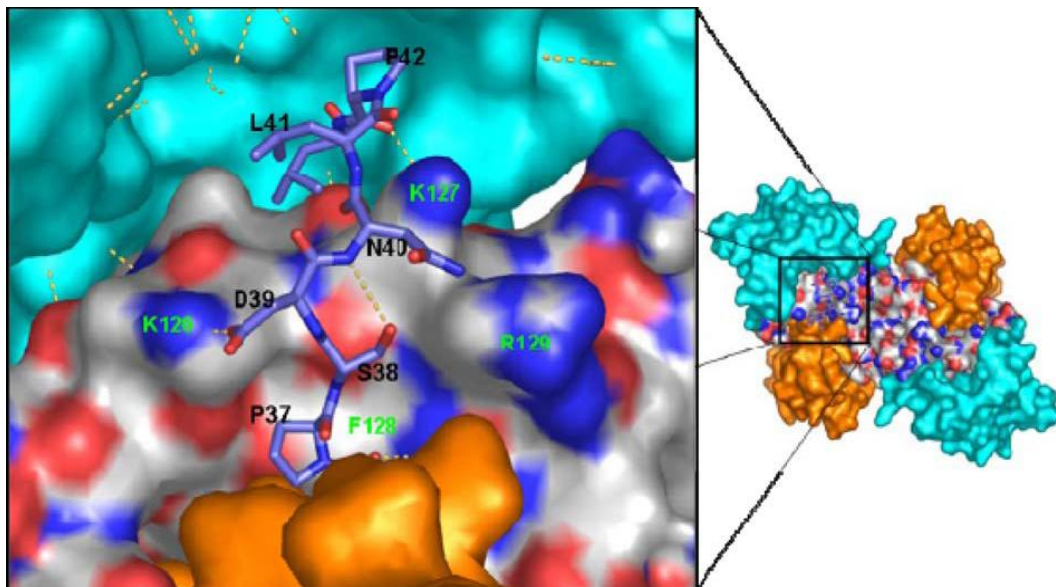


Abb. 14: Darstellung der BMP-7 Bindungsstelle im Noggin-Molekül aus⁽⁵⁵⁾
Noggin bindet ein BMP-7 Dimer in Rezeptor bindenden Epitopen

Chordin-Familie

Dieser Antagonist besitzt eine Größe von 120 kDa und bindet speziell an BMP-2, -4 und -7. Er funktioniert über einen komplizierten Interaktionsmechanismus mit anderen extrazellulären sekretorischen Proteinen⁽²⁵⁾. Chordin wird in undifferenzierten Chondrozyten stark exprimiert und sorgt dort für eine Hemmung der Zelldifferenzierung.

In OB wird die Funktion kontrovers diskutiert. Zum einen wurde herausgefunden, dass dort die Sekretion gering ist und keine hemmenden Einflüsse auf die Funktion der OB bekannt sind⁽²⁷⁾. Zum anderen ist aber auch klar, dass Chordin die osteoinduktive Aktivität der BMPs hemmt⁽⁴⁵⁾.

Twisted gastrulation-Familie (Tsg)

Tsg ist ein 23,5 kDa großes sekretorisches Protein, welches direkt mit BMP-2 und -4 interagiert. Es besitzt darüber hinaus nicht nur antagonistische Eigenschaften, sondern auch agonistische, indem es die Spaltung von Chordin durch BMP-1/tolloid verstärkt und so die hemmende Funktion von Chordin herabsetzt. Tsg wird in OB und KM-Stammzellen überexprimiert und in vitro verhindert es die Differenzierung von ST-2 Stromazellen in reife OB⁽²⁶⁾ und reduziert die Funktion von MC3T3-Zellen⁽⁶⁹⁾.

Dan-Familie

Diese Familie von Sekretionsproteinen besteht aus neun Mitgliedern, von denen Gremlin und Sclerostin insbesondere auf OB hemmende Wirkungen erzielen⁽²⁵⁾.

Gremlin bindet mit einer hohen Affinität BMP-2, -4 und -7 und hemmt die Differenzierung von KM-Stammzellen und OB in vitro⁽⁶⁸⁾.

Sclerostin wird typischerweise von OB, OZ und hypertrophierten Chondrozyten exprimiert und bindet BMP-2, -4, -5, -6 und -7. Es hemmt die Differenzierung und Funktion der OB in vitro⁽⁹⁵⁾ und induziert die Apoptose bei OB⁽⁸⁴⁾. Zudem kann Sclerostin mit Noggin einen Komplex bilden, der die antagonisierende Wirkung von Noggin dämpft⁽⁹⁶⁾.

Pseudorezeptor BAMBI

Dieser sogenannte Pseudorezeptor ist ein Glycoprotein mit einer extrazellulären Domäne, ähnlich der vom TGF- β und BMP-Rezeptor. BAMBI inhibiert die Effekte dieser aktivierten Rezeptoren ohne direkte Interaktion mit TGF- β oder BMP^{(25),(66)}. BAMBI wird in fertig differenzierten OB exprimiert und das Transskript durch BMPs oder TGF- β hochreguliert⁽³⁵⁾ (siehe Abb. 12).

Intrazelluläre BMP-Antagonisten

Zu dieser Gruppe von Antagonisten gehören die Gruppe der I-Smads (siehe 1.2.4.3) sowie die unter Punkt 1.2.4.7 aufgeführten Moleküle.

1.2.5. BMP-7

Das von uns in diesem Versuch benutzte BMP ist das BMP-7 oder auch OP-1 (osteogenic Protein 1) genannt. Diese Bezeichnung ist aber heutzutage obsolet. Vom BMP-7 ist seit Anfang der 90er Jahre bekannt, dass es bei einer subkutanen Implantierung in der Lage ist, in Muskelgewebe und zwischen Knochenfragmenten die Knochenbildung zu induzieren^{(30),(77)}.

Aufgrund dieser Tatsache und der technischen Möglichkeit, über rekombinante DNA BMP-7 herzustellen (erstmalig 1992), ist BMP-7, was den regenerierenden Effekt auf Knochen und Knorpel angeht, seither intensiv erforscht worden.

BMP-7 hat nachgewiesene fördernde Effekte in der Knochenheilung bei Röhrenknochen, bei offenen Tibiafrakturen und Spondylodesen, die in mehreren klinischen und präklinischen Studien untersucht worden sind^{(9),(10),(21),(22)}.

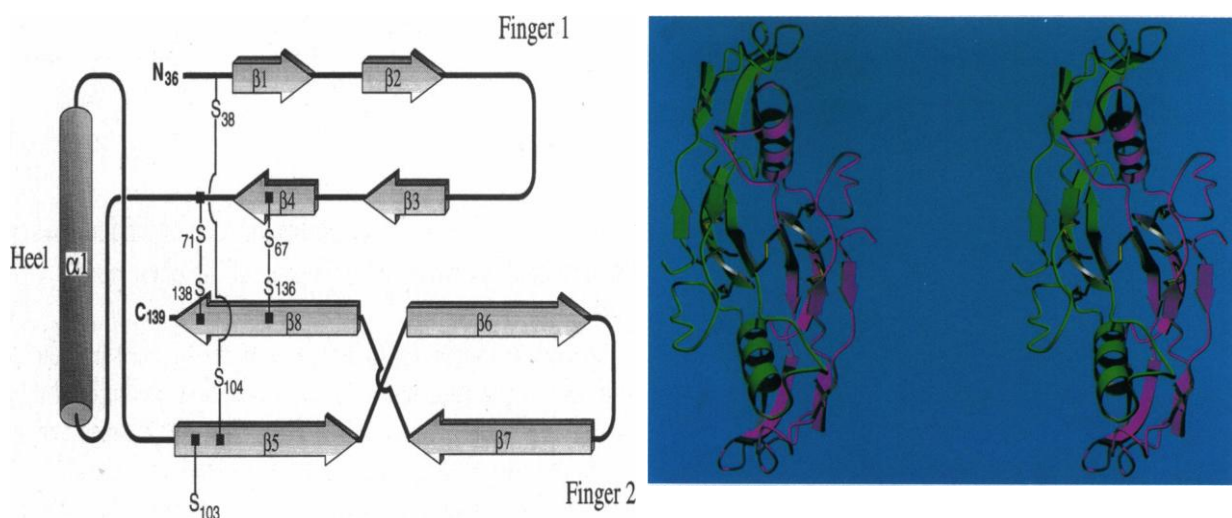


Abb. 15: aus ⁽³⁰⁾

Links: schematische Zeichnung eines BMP-7 Monomers. **Rechts:** Stereoview eines BMP-7 Dimers

Das BMP-7 Monomer besteht chemisch aus zwei sog. Fingern. Jeder dieser Finger besteht aus 4 β-Faltblattstrukturen und einer α-Helix (siehe Abb.15). Die beiden β-Faltblattstrukturen sind wieder durch mehrere Disulfidbrücken miteinander verbunden. Ein BMP-7 Dimer entsteht durch die Assoziation der α-Helix eines Monomers mit der Finger-Region eines anderen Monomers. Auch diese Strukturen werden durch Disulfidbrücken stabilisiert⁽³⁰⁾.

Was die Bindungskapazität angeht, wurde in Studien herausgefunden, dass BMP-7 die Möglichkeit hat, an ActR-1, BMPR-IA u. BMPR-IB in der Gegenwart von ActRII und ActRIIB zu binden⁽¹⁰⁰⁾, aber auch direkt an die ActRII und ActRIIB binden kann⁽⁵⁴⁾.

Dies zeigt, dass dem BMP-7 eine Reihe von Rezeptortypen zur Verfügung stehen, um die intrazelluläre Signalkaskade zu starten (siehe Abb.16). Zahlreiche in vitro Studien haben gezeigt, dass BMP-7 eine starke osteoinduktive, proliferative, differenzierende Wirkung auf OB oder auf mesenchymale Stammzellen hat. Shen et al zeigte 2010,

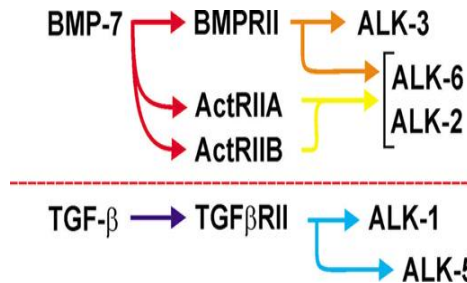


Abb. 16: BMP-7 Rezeptorbindungsmöglichkeiten aus:⁽¹⁰⁰⁾

dass sich humane KM-Stammzellen durch BMP-7 in Chondrozyten und OB differenzieren⁽⁷⁹⁾. Auch Lavery et al veröffentlichte 2009 ähnliche Beobachtungen⁽⁴⁷⁾.

Aber BMP-7 hat nicht nur auf OB diese osteoinduktiven Fähigkeiten, sondern umfasst auch Wirkungen auf Fibroblasten und die Knochen-Sehnen-Interaktion. Yamada et al beschrieb z.B. 2008 zum ersten Mal die Effekte von BMP-7 auf Sehnenzellen und dessen Auswirkungen auf die Matrix-Produktion⁽⁹⁹⁾.

2004 zeigte Mihelic et al die proliferative Wirkung von BMP-7 in der Knochen-Sehnen-Interaktion bei Schafen nach einer VKB-Plastik⁽⁵⁷⁾.

All diese Studien belegen das breite Spektrum von BMP-7 und erklären zudem auch, warum es in diesem Versuch als Wachstumsfaktor ausgesucht und untersucht wurde.

1.3. Zellarten die bei der Knochen-Sehnen-Interaktion, der VKB-Plastik und im in vitro Versuch beteiligt sind

1.3.1. Osteoblasten

Der Knochen, dessen Entstehung, Aufrechterhaltung und Neubildung, ist ein Zusammenspiel aus OB und Osteoklasten (OC), die in einem besonderem Gleichgewicht interagieren und den Knochenhaushalt kontrollieren. Die OB sind Zellen, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind, bedingt durch Mineralisierungsprozesse und die Produktion von Knochematrixproteine wie das Kollagen Typ I. Zum anderen aktivieren sie aber auch gleichzeitig OC, die im Knochen für die Resorptionsprozesse verantwortlich sind⁽³⁸⁾. OB entstammen wie auch Myoblasten, Chondrozyten und Adipocyten einer gemeinsamen Zelllinie, die als pluripotente Progenitor Zelle bezeichnet wird. Durch bestimmte exogene

Einflüsse, wie z.B. BMP-7, entwickeln sich durch die Aktivierung bestimmter Zielgene aus der pluripotenten Progenitor Zelle im Endeffekt OB (siehe Abb. 17 u. 18)⁽³⁸⁾.

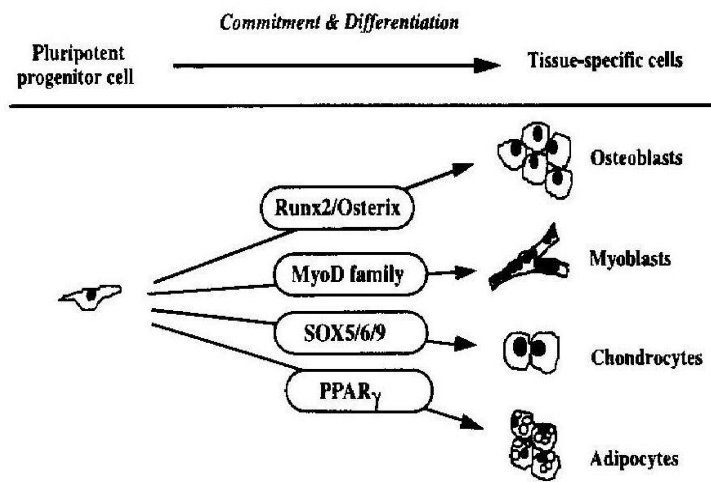


Abb. 17: Differenzierung pluripotenter Vorläuferzellen durch GF aus ⁽³⁸⁾

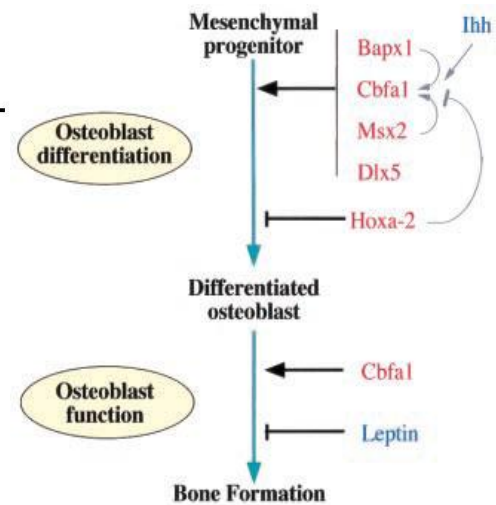


Abb. 18: Differenzierung von OB durch GF aktivierte Signalkaskaden aus ⁽¹³⁾

Der OB exprimiert auf seiner Membran eine Reihe von unterschiedlichen Rezeptorklassen, die für verschiedene GF spezifisch sind. Als Beispiel sei hier das BMP-7 erwähnt, das über den schon beschriebenen Smad-Signalweg OB spezifische Gene aktiviert. Aber neben BMP beeinflussen natürlich noch zahlreiche andere GF die Aktivität des OB durch die Transkription bestimmter Zielgene, wie z.B. durch TGFβ, FGF (Fibroblast growth factor) oder auch IGF (Insuline-like growth factor).

Knochengewebe besteht zum größten Teil aus Hydroxyapatit-Kristallen und verschiedenen Arten extrazellulärer Matrix, zusammengesetzt aus Kollagen Typ I, Osteocalcin (OCN), Osteonectin, Osteopontin, Sialoproteinen und Proteoglykanen⁽³⁸⁾. Die meisten dieser Knochenmatrix-Proteine werden durch OB sezerniert und abgelagert. Dafür sind wiederum eine Reihe von knochen-spezifischen extrazellulären Matrix-Proteinen notwendig, wie z.B. die alkalische Phosphatase (AP) o. das OCN⁽³⁸⁾.

Bildung der Knochenmatrix

Diese verläuft in unterschiedlichen Abschnitten und ist auf die Sekretion insbesondere von OCN und AP angewiesen. Als erstes sorgt OCN über die Bindung von Ca^{2+} für eine hohe Konzentration des Ions im Knochen. Diese hohe Ca^{2+} -Konzentration löst eine vermehrte Sezernierung von AP aus, die ihrerseits die lokale PO_4^- Konzentration ansteigen lässt. Diese Zunahme von PO_4^- sorgt für einen weiteren Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, was letztendlich den Mineralisierungsprozess triggert. Sind die Konzentrationen beider Ionen bis zu einem

bestimmten Punkt angestiegen, werden durch Exozytose Vesikel, die wiederum AP und Pyrophosphatase enthalten, in den intraossären Raum transportiert. Die letztendliche Matrix-Mineralisation verläuft dann durch die Bindung bzw. die Aufnahme der PO_4^- und Ca^{2+} Ionen in die Vesikel und deren chemischen Verbindung zu CaPO_4 . Diese Kristalle initiieren dann die weitere Mineralisation durch die Bildung und Ablagerung von $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, dem Hydroxyapatit (Abb.19) (Ablauf aus: M.H.Ross u. W. Pawlina, Histology a Text and Atlas, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins)⁽⁷⁴⁾.

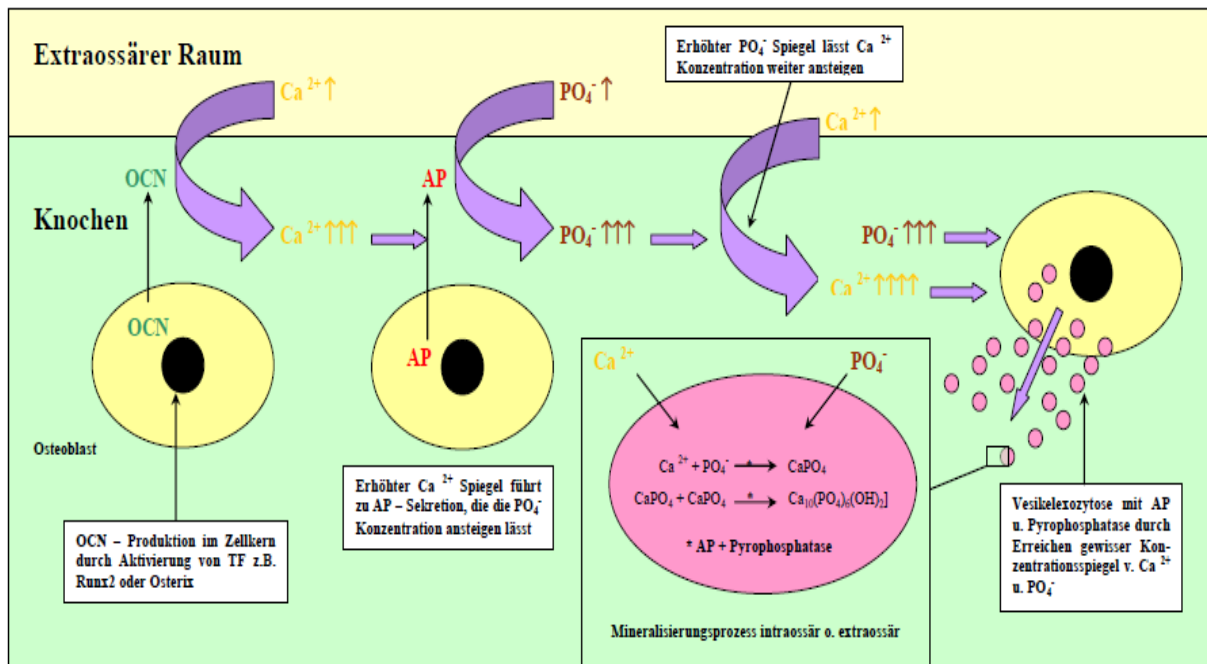


Abb.19: Schematischer Ablauf der Bildung einer Knochematrix

Die beiden für diesen Prozess verantwortlichen Proteine, OCN und AP, werden durch die Aktivierung bestimmter TF, wie z.B. Runx2 o. Osterix und über die Aktivierung der spezifischen Gene verstärkt exprimiert. Unterschiedliche GF, wie auch das BMP-7, haben u.a. an diesen TF ihren Angriffspunkt und steigern so gezielt die Ossifikations- bzw. osteoinduktiven Prozesse.

1.3.2. Fibroblasten

Fibroblasten sind bewegliche, aber ortsständige Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft und verantwortlich für die Synthese von Kollagenen, insbesondere von Kollagen Typ I und III⁽⁹⁰⁾, elastischen und retikulären Fasern. Zusätzlich produzieren sie für die EZM Substanzen wie Proteo- u. Glykosaminoglykane, Aggrecane, die für die erhöhte Festigkeit der EZM sorgen. Dabei stellen die Fibroblasten die aktivierte Form dar, in deren Zustand die

Produktion von den zuvor genannten Produkten stark erhöht ist. Diese Aktivierung findet z.B. bei Prozessen der Wundheilung, im Wachstum und Aufbau neuen Gewebes statt. Die inaktiven Formen dieser Zelltypen werden als Fibrozyten bezeichnet, bei denen es sich um nicht mehr aktive FB handelt, die sich in der von ihr produzierten EZM eingelagert haben. (Aus: M.H.Ross u. W. Pawlina, Histology a Text and Atlas, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins)⁽⁷⁴⁾. Fibroblasten spielen bei der Knochen-Sehnen-Interaktion und insbesondere bei der Einheilung von Sehnen-Transplantaten in den Knochen eine entscheidende Rolle⁽⁹⁰⁾.

Bisher sind leider nur wenige Studien veröffentlicht worden, die dieses Zusammenspiel in vitro beobachtet haben und zum anderen auch den Einfluss von BMP-7 auf Fibroblasten erforscht haben. Als Beispiel sei hier die Studie von Yamada et al angegeben, in der erstmalig der positive Einfluss von BMP-7 auf die Proliferation von Sehnen-Zellen und deren Synthese von Proteoglykanen und Kollagen nachgewiesen wurde⁽⁹⁹⁾.

1.3.3. Sehnen/Bänder

Sehnen bestehen aus parallel gebündelten Kollagenfasern, wobei auch hier die Kollagen-Typen I und III vorherrschend sind. Zwischen diesen Bündeln liegen Reihen von Fibroblasten, die hier als Tendinozyten bezeichnet werden und die die vorhandenen Kollagenfasern produzieren. Diese Tendinozyten sind noch einmal von einer spezialisierten EZM umgeben, die sie von den umgebenden Kollagenfasern trennt. Die gesamte Sehne ist umgeben von dem Epitendineum. Ausgehend von dieser Struktur wird die Sehne durch das Endotendineum in kleinere Bündel unterteilt. Durch das Endotendineum ziehen dann auch kleine Blutgefäße und Nerven mit, die die Sehne versorgen. (Aus: M.H.Ross u. W. Pawlina, Histology a Text and Atlas, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins)⁽⁷⁴⁾. Bänder sind wie Sehnen aufgebaut, bestehend aus parallelen Fasern und Fibroblasten. Im Gegensatz zu den Sehnen sind die Kollagenfasern weniger geordnet. Obwohl Kollagene den Hauptbestandteil der Bänder darstellen, beinhalten andere Bänder, je nach ihrer Lokalisation, noch andere Substanzen, wie z.B. elastische Fasern im Lig. flavum. (Aus: M.H.Ross u. W. Pawlina, Histology a Text and Atlas, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins)⁽⁷⁴⁾

1.4. Grundüberlegungen und allgemeine Fragestellung

Der Erfolg einer VKB-Plastik steht und fällt mit dem Erfolg des Einwachsens des Transplantats und dessen Integration im Bohrkanaal. Das Einwachsverhalten zu beschleunigen und die Festigkeit zu erhöhen, um so die Fehlerrate zu senken, ist von daher schon seit einigen Jahren Ziel mehrerer Arbeitsgruppen, sowie klinischer und experimenteller Studien gewesen.

In diesem Zusammenhang wurde natürlich auch untersucht, ob die bekannten osteoinduktiven und proliferativen Eigenschaften von BMP-7 auf den Knochen, auch einen positiven Einfluss auf das Einwachsverhalten und die Integration des Transplantats im Bohrkanaal besitzen⁽⁵⁷⁾.

Aufbauend auf dieser Grundlage, sollten mit diesem Versuch die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Wie verläuft das Einwachsverhalten bezüglich der Knochen-Sehnen-Interaktion?
2. Gibt es in diesem Zusammenhang störende Faktoren bei der Interaktion von OB und FB?
3. Können diese Prozesse durch die Gabe von BMP-7 beschleunigt werden?
4. Bestehen neben den proliferativen Eigenschaften von BMP-7 auch hemmende Faktoren?

Zusätzlich sollte durch diesen Versuch ein in-vitro-Modell entwickelt und etabliert werden, welches es ermöglicht, nachfolgenden Studien als Grundlage zu dienen.

Da viele vorherige Untersuchungen zu diesem Thema in-vivo-Studien waren und die in-vitro-Studien fast ausschließlich die Wirkung von BMP-7 auf Osteoblasten und nicht auf Fibroblasten untersucht haben, ist in dieser Studie sowohl der Einfluss auf Osteoblasten, als auch auf Fibroblasten untersucht worden.

Zudem sind in dieser Arbeit nach unserer Kenntnis Sehnen zum ersten Mal in vitro langzeitkultiviert worden.

2. Material

2.1. Laborgeräte und Instrumente

Autoklav	biomedis®	tuttnauer 3850 EL
Zellzähler	Casy1	Schärfe System
Zentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Centrifuge 5402	Eppendorf
Brutschrank	Heracell 150	Thermo scientific
Kühlschrank	Liebherr profi Line	Liebherr
Mikroskop	Leica DMIL	Leica
	Aristomet	Leitz
Wasserbad	Exatherm P5 electronic	Julabo/scientific Industries
Vortex	Vortex Genie 2	scientific Industries
Präzisionswaage	SBC 32	Scaltec
Magnetrührer	Schott	Schott-Instruments
	MR 2002	Heidolph
Mikrotom	PolycutE	Reichert-Jung
Vakuumpumpe		Heraeus
Critical point Kammer		
Sputter Coater		
REM		
Hubpipette	Multipette plus	Eppendorf
Pipette	Glison pipetman	

2.2. Chemikalien

Aqua dest			
NaCl 0,9%			
Casyton	CASY®ton	Schärfe System	Cat. No.: 043-90037 P Lot No.: 3105990
Fibrinkleber	TISSUCOL Duo S 1ml	Baxter	Cat. No.: Lot No.: 0704612
Earl's solution	Earl's solution 500ml	Biochrom Ag	Cat. No.: L1915 Lot No.:1299L

Ethanol absolut	Ethanol 5l	Fischer GmbH	Cat. No.: 451-1
- Ethanol 70%			Lot No.: 7129101
- Ethanol 80%			
- Ethanol 90%			
- Ethanol 100%			
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd 1kg	Merck	Cat. No.: 1.04005
			Lot No.: 9690305905
Xylol	Xylol 2,5l	J.T.Baker	Cat. No.: 8118
			Lot No.: 0734803003
Technovit	Technovit 9100 Neu	Heraeus Kulzer	Lot No.: 010054
Cacodylic acid	Cacodylic acid 100g	SERVA	Cat. No.: 15540
			Lot. No.: 071040
Sucrose	Sucrose 500g	SIGMA	Cat. No.: S-9378
			Lot No.: 32M0903
Glutardialdehyd-Lsg.	Glutardialdehyd-Lsg 250ml	Merck	Cat. No.: 1.04239
			Lot No.: C702039406
Aceton	Aceton 2,5l	Honeywell	Cat. No.: 10303370
			Lot No.: 81570
2-MEA	2-Methoxyethylacetat 2,5l	Merck	Cat. No.: 8.06061
			Lot. No.: 5298061909
BMP-7	BMP-7 4g	Stryker	
VitD3	Cholecalciferol 1g	SIGMA	Lot No.: C9756-1G
Gentamycin	Gentamycin 10ml	SIGMA	Lot. No.: 809M00724
AmphotericinB	AmphotericinB 100ml	PAA	Cat. No.: P11-001
			Lot No.: P00108-0712
FCS	FCS 500ml	PAA	Cat. No.: A15-101
			Lot No.: A10109-345
Accutase	Accutase 100ml	PAA Laboratory	Cat. No.: L11-007
			Lot No: H07123
Silbernitrat	Silbernitrat	Merck	Cat. No.: 1512
Natriumkarbonat	Natriumkarbonat 1kg	Merck	Cat. No.: 902
Formaldehyd-Lsg.	Formaldehyd-Lsg. 2,5l	Merck	Cat. No.: 1.04002
Natriumthiosulfat	Natriumthiosulfat 500g	Merck	Cat. No.: 6516
MgCl2	Magnesiumchlorid 250g	Merck	Cat. No.: 5833
ZnCl2	Zinkchlorid 100g	SIGMA	Cat. No.: Z4875
			Lot No.: 36H0380
TRIS	TRIS 1kg	USB	Cat. No.: 22643

			Lot No.: 80051
TritonX	TritonX 100ml	SIGMA	Cat. No.: T8787
			Lot No.: 052K0024
Perjodsäure	Perjodsäure 25g	Merck	Cat. No.: 1.00524
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat 1kg	Merck	Cat. No.: 1.06329
Chloralhydrat	Chloralhydrat 100g	SIGMA	Cat. No.: C-8383
			Lot No.: 118F0639
Harnstoff	Urea enzyme grade		:
DTT	DTT		Cat. No.:
Alcianblau	Alcianblau		Cat. No.:
Essigsäure 3%	Essigsäure 3%		Cat. No.:
Natriumazetat	Natriumazetat		Cat. No.:
Pararosanillin	Pararosanillin		Cat. No.:
Osmiumtetroxid	Osmiumtetroxid		
Penicillin	Penicillin		Cat. No.:
Streptomycin	Streptomycin		Cat. No.:
Salzsäure	Salzsäure		Cat. No.:
Natriumdisulfit	Natriumdisulfit		Cat. No.:
Hämatoxylin	Hämatoxylin		Cat. No.:
Natriumjodat	Natriumjodat		Cat. No.:
Aluminiumkaliumsulfat	Aluminiumkaliumsulfat		Cat. No.:
Zitronensäure	Zitronensäure		Cat. No.:

Lösungen und andere Reagenzien

Silbernitratlösung (5%):	Silbernitrat	5g
	Aqua dest	100ml
Primärfixations-Lsg.:	Cacodylic acid	5,35g
	Sucrose	8,56g
	Glutardialdehyd-Lsg. (25%)	30ml
Natriumthiosulfat-Lsg.:	Natriumthiosulfat	7g
	Aqua dest	133ml
Natriumkarbonat-		
Formaldehyd-Lsg.:	Natriumkarbonat	10g
	wasserfrei Formaldehyd-Lsg.	50ml
	Aqua dest	150ml

Alcianblaulösung:	Alcianblau	1g
	3%ige Essigsäure	100ml
	0,5%ige Perjodsäure	
	0,2 M Natriumazetat-Lsg	10ml
	→ Natriumazetat 0,272g in 10 ml Aqua dest	
	Perjodsäure	0,8g
	Aqua dest	20ml
	Ethanol abs.	70ml
Schiff'sches Reagenz:	Pararosanillin	5g
	1 N Salzsäure	150ml
Stammlösung II:	Natriumdisulfit	5g
	Aqua dest	850ml
Hämalaun:	Hämatoxylin	2,5g
	Natriumjodat	0,5g
	Aluminiumkaliumsulfat	125ml
	Aqua dest	2,5l
	Chloralhydrat	125g
	Zitronensäure	2,5g
Präinfiltrations-Lsg.:	Technovit	200ml
	Härter 1	1g
Infiltrations-Lsg.:	Technovit	250ml
	Härter 1	1g
	PMMA Puder	20g
Stocksolution A:	Technovit	500ml
	Härter 1	3g
	PMMA Puder	80g
Stocksolution B:	Technovit	50ml
	Härter 2	4ml
	Regulator	2ml
Schneideflüssigkeit (Alkohol 60%)		
Streckflüssigkeit (Alkohol 90%, Spülmittel)		

2.3. Puffer

PBS Dulbeco	Biochrom Ag Lot No.: 1333T		
REM-Puffer:	Cacodylat	0,1M	21,4g/l
	Sucrose	0,1M	34,2g/l

Lyse-Puffer (1L):	MgCl ₂	1mM	203,3mg
	TRIS	20mM	2422,8mg
	ZnCl ₂	0,1mM	13,63mg
	TritonX		250µl/250ml
Harnstoffpuffer:	Urea enzyme grade	8M	48,48g/100ml
DTT	20mM		0,3084g/100ml

2.4. Kulturmedium

BGJb Medium Fitton Jackson Modification	w/L-Glutamin	Lot No. L9102870
→ NaHCO ₃	1,2g/l	
→ Penicillin	5ml/l	
→ Streptomycin	5ml/l	
→ Gentamycin	5ml/l	
→ FCS	50ml/l	
→ Vit D3	400ng/ml	
→ BMP-7	40 ng/ml	

2.5. Test-Kits

ELISA-Assay 96 Well Plate:	LDH	Lot. No.: 03002098 122
→ Roche-Diagnostics Mannheim	- Reagenz 1: 80 mM N-Methylglucamin, (pH 9.4/37°C), 12.4 mM Lithium Lactat	
	- Reagenz 2: 12.4 mM Nicotin-Adenin-Dinucleotid Lactat	Lot. No.: 11822837 190
	- Reagenz 1: gepufferte Ascorbatoxidase 6 U/ml; 100 µkat/l; H-donor	
	- Reagenz 2: 0.2 mg/ml (0.98 mM) 4-Amino-Antipyrin, mikrobieller LOD (3 U/ml; 50 µkat/l) und Meerrettich POD (4.8 U/ml; 80 µkat/l)	
	ALP/AP	Lot. No.: 12172933 122
	- Reagenz 1: 224mM 2-amino-2-methyl-1-propanol (pH 10.44 / 30°C), 0.5 mM Magnesiumacetat, 0.1 mM Zinksulfat, 0.5 mM N-(2-Hydroxyethyl)-ethylen-diamin- triacetic acid	

OCN-ELISA 96 Well Plate:

Micro Vue Bone Health Quidel Corporation

Lot No.:906333 / Cat. No.: 8002

2.6. Verbrauchsmaterialien

Einbettkästen	Einbettkästen	medite Medizint.	Cat. No.: 41-1100-00
Einmalhandschuhe	Nobaglove Latex		Cat. No.: 905453
Einmalhandschuhe	Reha Profile Plus	Hartmann	Cat. No.: 9426951
Einmalpinzetten	Reha Einmalpinzette	Hartmann	Cat. No.: 9995650
Einmalskalpell	Surgical Disposable Scalpel	B/Braun	Cat. No.: 5518067
Falcon Tubes	Falcon Tubes	greiner bio-one GmbH	
	15ml	Cat. No.: 4-2095-6	
	50ml	Cat. No.: 227261	
Glaspipetten	Glaspipetten 10ml	greiner bio-one GmbH	Cat. No.: 607180
Kulturgefäße	5Cellstar Tissue culture dishes	greiner bio-one GmbH	Cat. No.: 639160
	15Cellstar Tissue culture dishes	greiner bio-one GmbH	Cat. No.: 664160
	Lumox DISH 35 TC-Qualität	greiner bio-one GmbH	Cat. No.: 9607331
Objektträger	Superfrost Plus Objektträger	Thermo scientific	Cat. No.: J1800 AMNZ
Parafilm	Laboratory Film	American Nat. Can TM	
Pasteurpipette	Pasteurpipette Natron-Kalk-Glas	BRAND	Cat. No.: 747720
Pipettenspitzen	Tip One Bevelled Filter Tips		
	0,1 – 10µl		Cat. No.: S1120-3810
	1 – 20µl		Cat. No.: S1120-1810
	1 – 50µl		Cat. No.: S1120-2810
	1 – 200µl		Cat. No.: S1111-1810
	1 – 1000µl		Cat. No.: S1126-7810
Probenbehälter	Probenbehälter	Kobe	Cat. No.: 0807-31
Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe Lock Tubes	Eppendorf	
	1,5ml		Cat. No.: 0030120086
	2,0ml		Cat. No.: 0030120094
Spritzenvorsatzfilter	Spritzenvorsatzfilter	Fisherbrand	Cat. No.: 3700699
Sterile Abdecktücher	Foliodrape Abdecktücher	Hartmann	Cat. No.: 2513026
Sterifilter	Bottle Top Filter	Nalgene	Cat. No.: 291-4520
Zellkulturschale	Tissue Culture Flasks5	greiner bio-one GmbH	Cat. No.: 658170
Wellplates	Tissue Culture Plates	greiner bio-one GmbH	
	6 Well		Cat. No.: 657160
	96 Well		Cat. No.: 655180

3. Methoden

3.1. Versuchsbeschreibung

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels zweier Versuche, den Effekt von BMP-7 auf Sehnen, OB und FB zu untersuchen und dabei zu dokumentieren, ob durch eine Gabe von BMP-7 Wachstums- und Integrationsprozesse beschleunigt werden können, positive Effekte bezüglich der Knochen-Sehnen-Interaktion hervorgehen und ggf. auch bislang nicht bekannte fördernde oder hemmende Faktoren zu beobachten sind.

Diesbezüglich wurde die Arbeit in zwei Versuche aufgeteilt: Einem Hauptversuch, mit einer Laufzeit von 10 Wochen, der sich primär um den Einfluss von BMP-7 auf die Sehnen-Kulturen richtete und einem Zusatzversuch, mit einer Laufzeit von 24 Tagen, der primär das Ziel hatte, den BMP-7 Einfluss auf, in in-vitro befindliche, OB und FB zu untersuchen.

Dadurch sollte gewährleistet werden, dass alle Bestandteile die bei einer VKB-Plastik in Kontakt zu einander treten, nämlich Sehnen-Transplantat, FB aus dem Transplantat und OB im Bohrkanal, in Bezug auf das BMP-7, beobachtet werden.

3.1.1. Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden in-vitro-Kulturen, bestehend aus OB und Sehnen, hergestellt, die über einen Zeitraum von 10 Wochen beobachtet worden sind. Es wurden in diesem Zusammenhang vier Gruppen erstellt, um die verschiedenen Effekte besser unterscheiden und beobachten zu können. Alle vier Gruppen enthielten bovine Sehnen (pro Gruppe n=9), die vorher präpariert und mittels eines Fibrinklebers in der Kulturschale fixiert wurden. Gruppe 1 enthielt neben der Sehne die Zugabe von vorher kultivierten bovinen OB und erhielt bei jedem Mediumwechsel (MW) eine Applikation von 400 ng/ml BMP-7. Gruppe 2 enthielt neben der Sehne nur die Zugabe von bovinen OB und wurde nicht mit BMP-7 versorgt. Gruppe 3 enthielt nur die Sehne, wurde aber, wie die Gruppe 1, bei jedem MW mit 400 ng/ml BMP-7 versorgt. Gruppe 4 enthielt nur die Sehne und bekam weder bovine OB noch BMP-7 appliziert (siehe auch Abb. 20). Als Kontrolle diente das reine Medium mit OB.

Die Sehnen und Zellen aller Gruppen wurden mit BGJ-Medium (50 ml/l FCS, 400 ng/ml VitD₃, 1,2 g/l NaHCO₃ und je 5ml/l Streptomycin, Gentamycin und Penicillin) kultiviert. Die Versorgung der Zellkulturen, incl. der Sehnen, der Gruppen 1-4 und der Kontrollgruppe (Medium+OB) erfolgte im Brutschrank bei 100% Luftfeuchtigkeit (5% CO₂) und einer

Temperatur von 37°C. Alle zwei Tage erfolgte ein MW. Im Abstand von 7 Tagen wurden, bei den durchzuführenden MW, die Mediumüberstände abpipettiert, in Eppendorf-Hütchen überführt und anschließend bei -80°C tiefgefroren und für spätere klinisch-chemische Analysen verwendet. Im Abstand von 28 Tagen wurden aus jeder Gruppe 3 der Kulturschalen entnommen, von denen zwei Kulturen für die Bestimmung der AP nach Zelllyse und eine für die histologische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Sehne verwendet wurden. Der Versuch endete nach einer Gesamtlaufzeit von 10 Wochen (70 Tage) (siehe Abb.20).

In vitro Hauptversuch

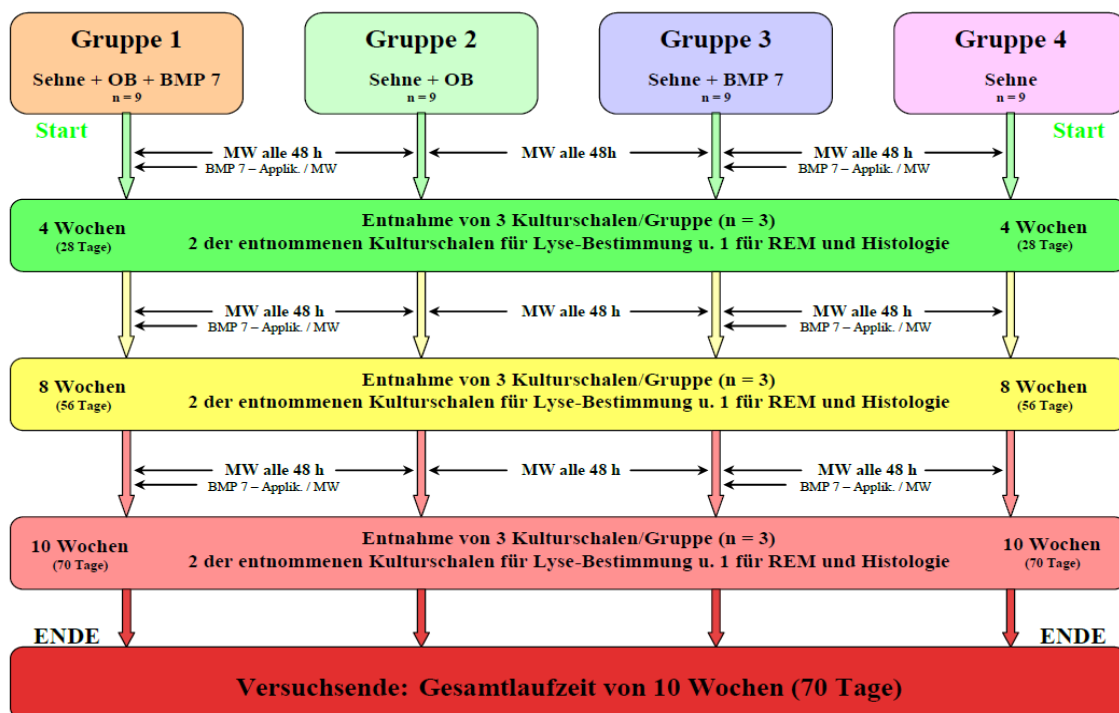


Abb. 20: **Aufbau und Ablauf des Hauptversuches**

OB = Osteoblasten, MW = Mediumwechsel, REM = Rasterelektronenmikroskopie, Lyse = Zell-Lyse

3.1.2. Zusatzversuch

Im Zusatzversuch sollten die Veränderungen von zellulären Eigenschaften der beteiligten Zellen unter der Zugabe von BMP-7 untersucht werden. Zu diesem Anlass wurden mehrere Gruppen gebildet: In Gruppe 1 wurde bei jedem MW 400ng/ml BMP-7 appliziert. Bei der Gruppe 2 wurden OB ohne Zugabe von BMP-7 kultiviert. In Gruppe 3 wurden FB kultiviert, die beim 48stündigen MW jeweils 400 ng/ml BMP-7 erhielten. In Gruppe 4 wurden FB ohne Zugabe von BMP-7 kultiviert. In Gruppe 5 wurden OB und FB in einem Verhältnis von 80%

zu 20% kultiviert, die mit 400 ng/ml BMP-7/MW versorgt wurden und Gruppe 6 enthielt nur die reine Mischkultur aus OB und FB ohne eine BMP-7 Applikation.

Die im Auswachsverfahren gezüchteten OB und FB wurden in einer Konzentration von 320000 Zellen/ml in 6 Well-Plates ausgesät, wobei für jede Gruppe sechs 6Well Plates mit den gezüchteten Zellen beimpft wurden (n=36). Die Zellzahlermittlung erfolgte am Casy-Zellzähler (siehe auch Abb. 21).

Alle sechs Gruppen wurden mit BGJ-Medium (50 ml/l FCS, 400 ng/ml VitD₃, 1,2 g/l NaHCO₃ und je 5ml/l Streptomycin, Gentamycin und Penicillin) versorgt. Diese sechs Gruppen wurden dann im Brutschrank bei 100% Luftfeuchtigkeit (5% CO₂) und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein MW, alle 4 Tage wurden die Mediumüberstände abpipettiert, in Eppendorf-Hütchen überführt und anschließend bei –80°C tiefgefroren und für spätere klinisch-chemische Analysen verwendet. Ebenfalls alle vier Tage wurde pro Gruppe eine 6 Well-Plate entnommen (n=6) und für die Zelllyse aufbereitet. Die gewonnenen Lysate wurden bis zur weiteren klinisch-chemischen Analyse bei –80°C gelagert. Die Gesamtlaufzeit dieses Versuches betrug 24 Tage (siehe Abb. 21).

In vitro Zusatzversuch

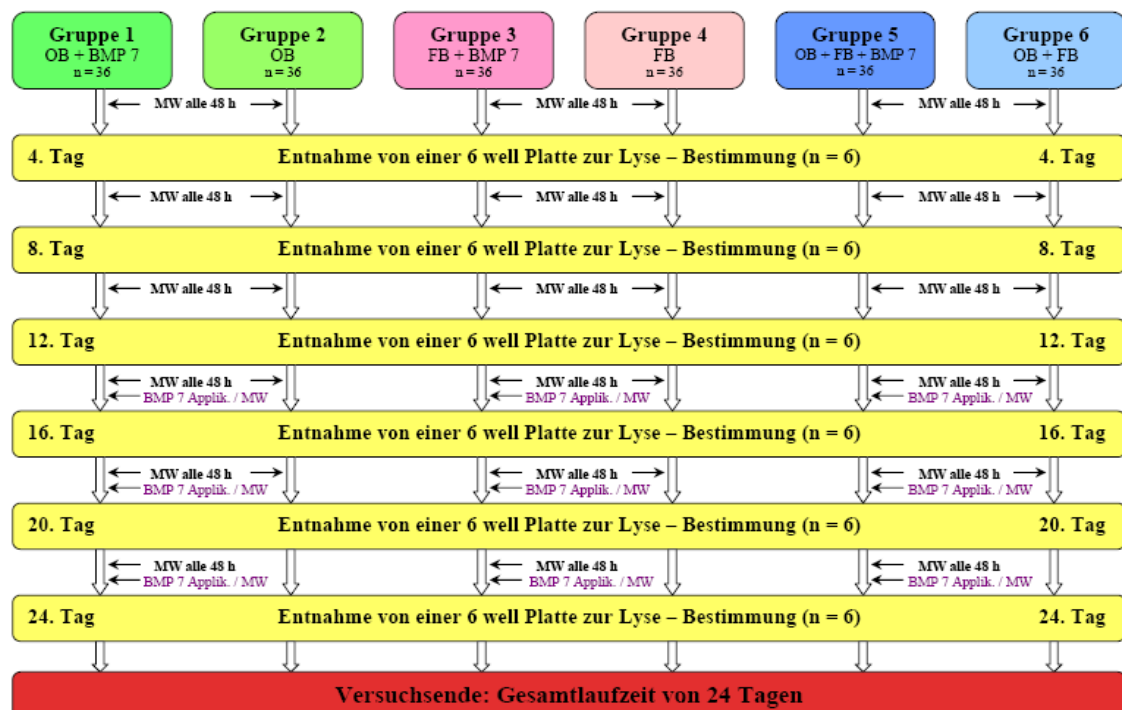


Abb. 21: **Aufbau und Ablauf des Zusatzversuches**

OB = Osteoblasten, FB = Fibroblasten, MW = Mediumwechsel, Lyse = Zell-Lyse,

3.2. Präparation von bovinem Periost für das Auswachsverfahren von OB zur Gewinnung von Prä-Osteoblasten (POB)

Das Periost ist die äußerste, den Knochen umgebende, Schicht, die man in eine äußere (fibrous layer) und eine innere (osteogenic layer) Seite unterteilt. Während die äußere Seite mit FB bestückt ist, enthält die innere Seite Progenitorzellen, die sich in OB entwickeln.

Methodik zur Anzüchtung von Osteoblasten:

Der Unterschenkel eines frisch geschlachteten Rindes wird nach Entfernung des Fells im Labor gründlich mit Wasser gereinigt. Im Anschluß erfolgt eine Säuberung mit 96% Alkohol. Für 15 min. wird der Unterschenkel dann in diesem belassen. Hiernach erfolgt unter sterilen Bedingungen die Abpräparation der Muskeln und Sehnen. Nach Entfernung des Fettgewebes liegt das Periost frei. Mit einem Einmalskalpell wird das Periost eingeschnitten, wobei der Schnitt eine Höhe von ca. 0,5cm und eine Länge entsprechend der Diaphyse aufweist. Zuletzt wird das Periost vorsichtig mit einer Pinzette vom Knochen abgezogen und in eine Kulturschale mit EARLE's Salt Solution überführt. Die präparierten Perioststreifen werden 3x20 min. bei 37°C auf einem rotierenden Schüttler gewaschen. Im Anschluss erfolgt ein Waschgang für 20 min. bei 37°C, bei dem der EARLE's Salt Solution 500000U/l Penicillin und Streptomycin, 10ml/l Gentamycin und 2mg/l Amphotericin B hinzugeführt wurde. Nach diesem Waschgang werden die Perioststreifen in einer Zellkulturschale (D=15cm) in 0,5x0,5 cm große Stücke geschnitten und im Anschluss je 8 Stück gleichmäßig in eine neue Zellkulturschale (D=15cm) überführt, um ein konfluentes Auswachsen der POB zu ermöglichen. Hierbei ist zu beachten, dass die innere, die knochen nahe Seite auf den Boden der Zellkulturschale platziert wird. Jede Zellkulturschale wird mit 15ml frischem BGJ-Medium (komplett) versorgt und bei 100 % Luftfeuchtigkeit (5% CO₂) und 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Einmal pro Woche wird das Medium gewechselt, bis nach ca. 4 Wochen ein konfluenten Zellrasen entstanden ist. Dieser Zellrasen wird nach 3 maligem Spülen mit PBS und Accutase (6ml/Schale) abgelöst und in 20ml BGJ-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wird bei 1400U/min/RT zentrifugiert und der Mediumüberstand verworfen. Das Zellpellet wird in frischem BGJ-Medium resuspendiert und auf Eis zwischen gelagert. Als letzten Schritt wird die Zellsuspension mit 4-6°C kaltem Einfriermedium (incl. 20% DMSO) 1:1 in einem Kryoröhrchen gemischt, gekennzeichnet und in flüssigem Stickstoff bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.3. Präparation von bovinen Sehnen für das Auswachsverfahren und die Züchtung von Sehnenfibroblasten

Der Unterschenkel eines frisch geschlachteten Rindes wird nach Entfernung des Fells im Labor gründlich mit Wasser gereinigt. Im Anschluß erfolgt eine Säuberung mit 96% Alkohol. Für 15 min. wird der Unterschenkel dann in diesem belassen. Hiernach erfolgt unter sterilen Bedingungen die Abpräparation der Muskeln und Sehnen. Bevorzugt werden Sehnen präpariert, die in Sehnengleitgewebe geschützt vorliegen. Diese werden dann vorsichtig aus den Sehnenfächern herausgelöst und vom Muskel abgetrennt und in PBS zwischengelagert (Abb. 22 A-C)

Mit einem Einmalskalpell werden die Sehnen in 2-3 cm große Stücke geschnitten und in EARLE's Salt Solution überführt. Die präparierten Sehnenstreifen werden 3x20 min. bei 37°C auf einem rotierenden Schüttler gewaschen. Im Anschluss erfolgt ein Waschgang für 20 min. bei 37°C, bei dem der EARLE's Salt Solution 500000U/l Penicillin und Streptomycin, 10ml/l Gentamycin und 2mg/l Amphotericin B hinzugeführt wurde (siehe Abb. 22 D-F). Nach diesem Waschgang werden die Sehnenstreifen in einer Zellkulturschale (D=15cm) in 0,5x0,5 cm große Stücke geschnitten und im Anschluss je 6-8 Quadrate gleichmäßig in eine neue Zellkulturschale (D=15cm) überführt, um ein konfluentes Auswachsen der FB zu ermöglichen. Jede Zellkulturschale wird mit 15ml frischem BGJ-Medium (komplett) versorgt und bei 100% Luftfeuchtigkeit (5% CO₂) und 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Im Abstand von 7 Tagen wird das Medium gewechselt, bis nach ca. 28 Tagen ein konfluenter Zellrasen entstanden ist. Dieser Zellrasen wird nach 3 maligem Spülen mit PBS und Accutase (6ml/Schale) abgelöst und in 20ml BGJ-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wird bei 1400U/min/RT zentrifugiert und der Mediumüberstand verworfen. Das Zellpellet wird in frischem BGJ-Medium resuspendiert und auf Eis zwischen gelagert. Als letzten Schritt wird die Zellsuspension mit 4-6°C kaltem Einfriermedium (incl. 20% DMSO) 1:1 in einem Kryoröhrchen gemischt, gekennzeichnet und in flüssigem Stickstoff bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

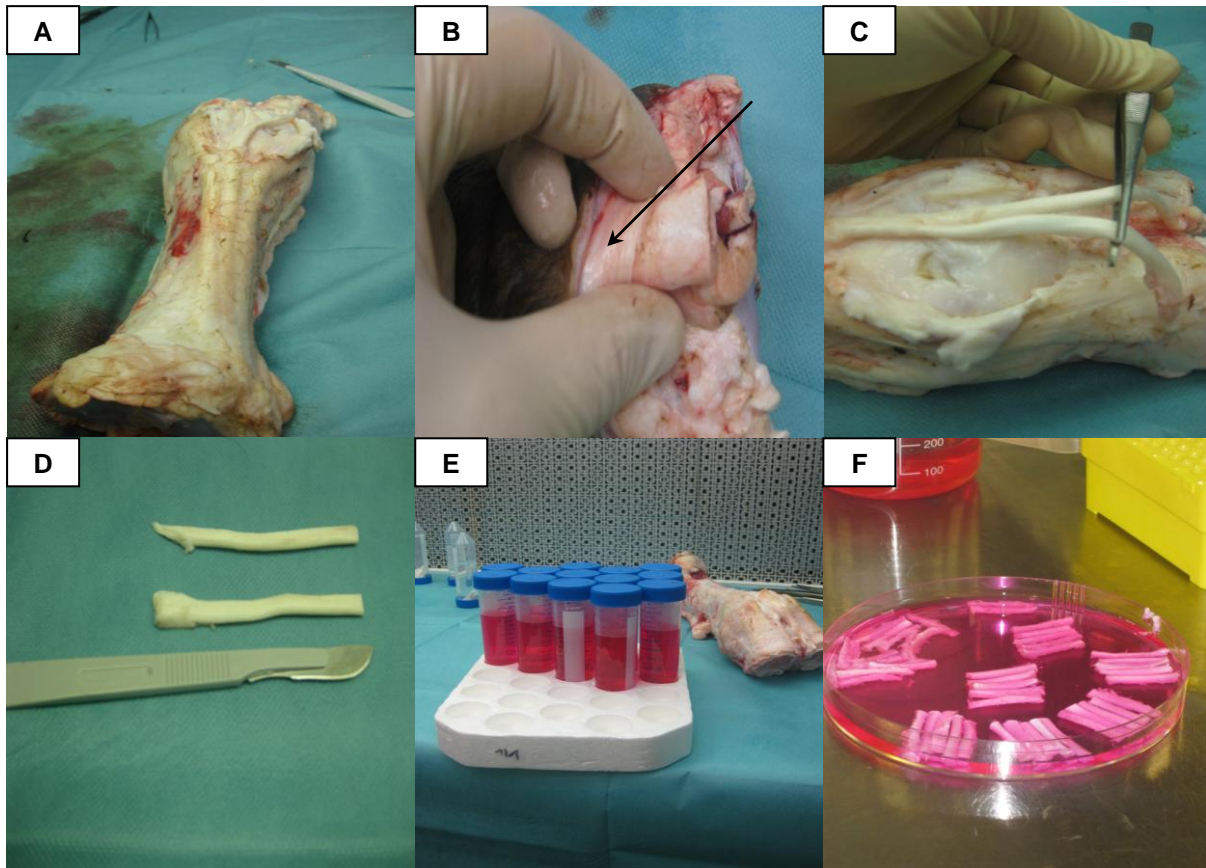


Abb.22 A - F: A: boviner Unterschenkel vor Präparation, B: Sehne in Sehnenscheide (Pfeil)
C: Präparation der Sehne aus Sehnenscheide, D: Sehnen nach der Herauslösung
E: Sehnen in EARLE's Solution F: Sehnen nach Waschgängen in BGJ-Medium

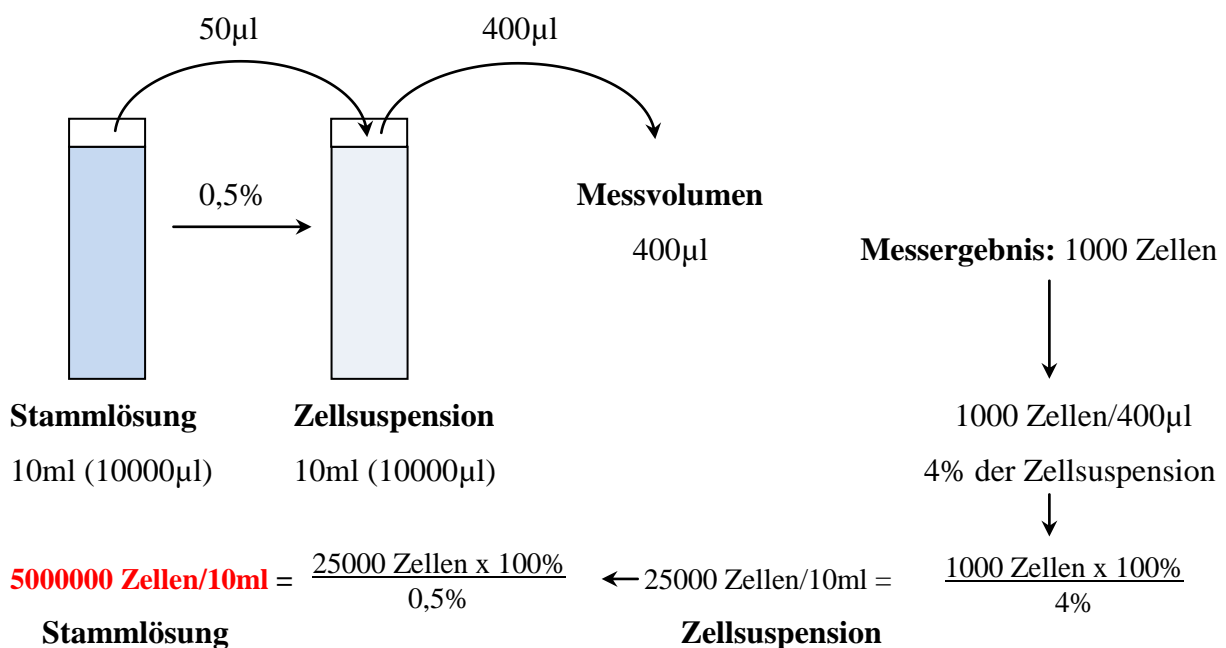
3.4. Arbeitsschritte und Abläufe im Hauptversuch

3.4.1. Zellzählung von POB und deren Aussaat

Nach mikroskopischer Beurteilung des Auswachsverhaltens der POB erfolgt die Ablösung dieser von der Kulturschale. Dazu werden die POB 2-3 mal mit 12ml PBS gewaschen und anschließend mit 8ml Accutase pro Kulturschale versorgt und für 10-15 min. im Brutschrank belassen. Sind die Zellen vom Boden abgelöst (mikroskopische Beurteilung), werden zur Kulturschale 10ml BGJ Medium hinzugegeben und eine Zellsuspension erstellt. Die Kulturschale wird mehrere Male mit dem Versorgungsmedium überspült, um alle abgelösten Zellen in der Suspension in ein 50ml Falcon Tube überführen zu können. Die überführte Zellsuspension wird nun mit BGJ auf 30ml aufgefüllt und für 10 min. bei 1600 U/min. zentrifugiert. Aus dem Falcon Tube wird der Mediumüberstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10ml BGJ Medium aufgefüllt und bis zu 20 mal resuspendiert. Zur Zellzählung der Stammlösung der POB wird der CASY[®] 1-Zellzähler benutzt.

Ablauf der Zellzählung:

Als eine zentrale Rolle zur Bestimmung der Zellproliferation wird zu Beginn des Versuchs die Anzahl an Zellen bestimmt, die für die weitere Kultivierung verwendet werden. Zur Messung wird in einem Casy[®] cup genau 9950µl Casyton isotonische Salzlösung einpipetiert und zu dieser dann 50µl der vorher aufbereiteten Stammlösung hinzugegeben, welches 0,5% der Stammlösung entspricht. Die beiden Lösungen werden gut gemischt und anschließend die Zellzahl durch Ansaugen von 400µl bestimmt. Die Messungen werden dreimal wiederholt und im Anschluss ein Mittelwert erstellt, der angibt, wie viele vitale Zellen sich in der Zellsuspension befinden (Prinzip der Zelldichtebestimmung siehe unten). Sind bei der Messung z.B. 1000 vitale Zellen pro 400µl gemessen worden, ergibt das eine Zellzahl in der Stammlösung von 5 Mio. Zellen/10 ml (siehe Rechenbeispiel unten).



In diesem Versuch betrug das Volumen des Versorgungsmediums 2,5ml pro Lumox Kulturschale. Für das Rechenbeispiel bedeutet dies, dass pro Kulturschale 1250000 vitale Zellen bei der ersten Medium Applikation ausgesät wurden.

Prinzip der Zelldichtebestimmung mit dem CASY[®] 1-Zellzähler

Der CASY[®] 1 Cell Counter ist ein elektronischer Zellzähler, welcher nach dem Widerstandsmessprinzip arbeitet. Bei jeder Messung werden aus dem Probenbecher mit isotoner Elektrolytlösungs-Suspension (Zellsuspension in CASY[®] ton) 400µl in eine Kapillare eingesaugt. Diese Messkapillare hat einen Innendurchmesser von 150µm. Über zwei Platinelektroden ist eine elektrische Spannung angelegt und sobald eine Zelle in die Messkapillare eindringt, entsteht durch eine Änderung des elektrischen Widerstands ein

elektrischer Puls. Diese Widerstandsänderung kann entstehen, da eine Zelle wie ein Isolator in einer Säule mit Elektrolytlösung wirkt. Diese Säule wird durch die Messkapillare begrenzt und stellt einen definierten Widerstand dar. Werden mehrere Zellen in die Messkapillare eingesaugt, so entstehen entsprechend mehrere Pulse.

Die Anzahl der Pulse stellt dann die Zellzahl in der Probe dar. Der CASY[®]1 Cell Counter kann auch die Größe der Pulse unterscheiden und somit eine Größenverteilung darstellen. Die größeren Pulse stellen die vitalen Zellen dar, die kleineren Pulse Zelldebris oder tote Zellen. Avitale Zellen verursachen einen kleineren Puls, da ihre Zellmembran durchgängig ist. Es wird bei diesem Verfahren nur der Zellkern als Puls gewertet. Vor jedem Experiment sollte einmal eine Kalibrierung durchgeführt werden, sowie vor jeder Messung zur Kontrolle eine Spülung mit reiner Elektrolytlösung.

Nach jedem Experiment sollte die Messkapillare gut gespült und mit CASY[®] clean Lösung gesäubert werden.

3.4.2. Fibrinfixierung boviner Sehnen

Die präparierten Sehnenabschnitte wurden mittels Tissucol-Fibrinkleber zentral in die Lumox Kulturschalen eingeklebt. Dieser ist ein zwei Komponenten Kleber, welcher nach Herstellervorschrift angewärmt und im Verhältnis 1:1 (5µl pro Komponente) an zwei Stellen der Lumox-Kulturschale zur Fixierung der Sehnenabschnitte eingebracht wurde. Nach der Fixierung erfolgte die Versorgung mit BGJ-Medium, entsprechend dem gewünschtem Volumen von 2,5ml/Lumox-Kulturschale (s. Abb. 23). Je nach Gruppenzugehörigkeit erfolgte die Aussaat von 320000 POB/ml in das Versorgungsmedium, wie in 3.3.1. beschrieben.

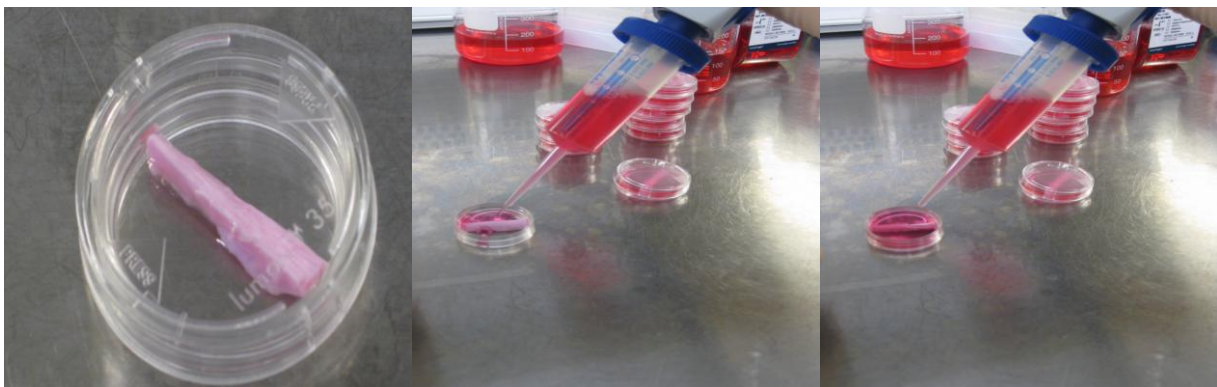


Abb. 23: Fixierung der Sehne in Lumox-Kulturschale und Versorgung mit 2,5 ml BGJ-Medium

3.4.3. Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 100% Luftfeuchtigkeit (5% CO₂) und 37°C kultiviert (siehe S. 42, Abb. 20).

3.4.4. Versorgung der Zellkultur

Alle 48 h wurde das Medium gewechselt. Das Medium wurde dabei vorher auf 37°C erwärmt und mit 400ng/ml VitD₃ gemischt. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde dem Versorgungsmedium auch 400ng/ml BMP-7 zugegeben (Gruppe 1 u.3).

3.4.5. Analyt- bzw. Probengewinnung

Jeden siebten Tag wurde das Kulturmedium zwecks weiterer Bestimmungen beim MW in 2ml Eppendorf Cups überführt und bei –80°C eingefroren. Vor diesem MW erfolgte einen Tag vorher ein MW mit FCS freiem Medium. Alle 28 Tage wurden aus jeder Gruppe 3 der Proben aus dem laufenden Versuch herausgenommen. Von diesen Proben wurden 2 für die Zelllyse weiter bearbeitet und 1 Probe zur Histologie und REM aufbereitet (siehe S. 42, Abb. 20).

3.4.6. Zelllyse zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die vorher entnommenen Lumox-Kulturschalen (siehe Abb. 20 u. 3.3.5.) wurden 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5ml Lyse Puffer befüllt und auf Eis kühl gelagert. Die Sehnen wurden aus der Lumox-Kulturschale herausgenommen und in Histologie Einbettkästen überführt und katalogisiert. Die verbliebenen Zellen in den Lumox-Kulturschalen wurden mittels eines Rührstabes vom Boden abgelöst und möglichst gut homogenisiert. War eine gleichmäßige Zellsuspension entstanden, wurde diese in vorher beschriftete 1,5ml Eppendorf Cups überführt und bei – 80°C für weitere Bestimmungen tiefgefroren.

3.5. Arbeitsschritte und Abläufe im Zusatzversuch

3.5.1. Zellzählung von POB, FB und Mischkultur und deren Aussaat

Nach mikroskopischer Beurteilung des Auswachsverhaltens der POB und FB erfolgte deren Aufbereitung. Dazu wurden die POB und FB 2 bis 3 mal mit 12ml PBS gewaschen und anschließend mit 8ml Accutase pro Kulturschale versorgt und für 10 bis 15 min. im Brutschrank belassen. Hatten die Zellen sich vom Boden abgelöst (mikroskopische Beurteilung), wurde zur Kulturschale 10ml BGJ-Medium hinzugegeben und eine Zellsuspension erstellt. Die Kulturschale wurde dann ca. 20-mal mit dem Versorgungsmedium überspült und die abgelöste Zellsuspension in ein 50ml Falcon Tube überführt. Die Zellsuspension wurde nun mit BGJ auf 30ml aufgefüllt und für 10 min. bei 1600 U/min. zentrifugiert. Aus dem Falcon Tube wurde der Mediumüberstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit 10ml BGJ-Medium aufgefüllt und bis zu 20-mal resuspendiert. Zur Zellzählung der Stammlösungen der POB und FB wurde der CASY[®] 1 Zellzähler benutzt. Dieser musste vor Beginn mehrere Male mit Casyton Flüssigkeit gespült werden. Zur Messung wurden dann in einem Probenbecher genau 9950µl Casyton-Flüssigkeit einpipetiert und zu dieser dann 50µl der vorher aufbereiteten Stammlösung hinzugegeben. Die beiden Lösungen wurden gut gemischt und anschließend die Zellzahl durch Ansaugen von 400µl bestimmt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt und im Anschluss ein Mittelwert erstellt (Prinzip der Zellzahlbestimmung siehe auch Ablauf der Zellzählung, S. 47).

In diesem Versuch betrug das Volumen des Versorgungsmediums 2,5ml pro Lumox Kulturschale. Für die Erstellung der POB-FB-Mischkultur im Verhältnis 80:20, wurde der bestimmte Zellgehalt aus der Stammlösung der POB und FB entsprechend dem Verhältnis entnommen und gemischt.

3.5.2. Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 100% Luftfeuchtigkeit (5% CO₂) und 37°C kultiviert (siehe S. 43, Abb. 21).

3.5.3. Versorgung der Zellkultur

Alle 48 h wurde das Medium gewechselt. Das Medium wurde dabei vorher auf 37°C erwärmt und jede Kulturschale/Gruppe erhielt 400ng/ml VitD₃. Je nach Gruppenzugehörigkeit (Gruppe 1, 3 und 5) erfolgte ab dem 3. MW die regelmäßige Applikation von 400ng/ml BMP-7 bei jedem MW (siehe S.43, Abb. 21).

3.5.4. Analyt- bzw. Probengewinnung

Jeden vierten Tag wurde das Kulturmedium zwecks weiterer Bestimmungen beim MW in 2ml Eppendorf Cups überführt und bei -80°C eingefroren. Ebenfalls alle 4 Tage parallel, zum Einfrieren des Mediumüberstandes, wurde aus jeder der sechs Versuchsgruppen eine 6 Well-Plate aus der laufenden Versuchsreihe entnommen (siehe S.43, Abb. 21) und im weiteren Verlauf zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase aufbereitet, wie in 3.5.5. beschrieben.

3.5.5. Zelllyse zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die aus der laufenden Versuchsreihe entnommene 6 Well-Plate (pro Versuchsgruppe) wurde zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase aus der Zelllyse 2 x mit 2ml PBS bei RT gewaschen, die Zellen mit 0,5ml Accutase unter Mikroskopkontrolle abgelöst und in ein mit 1,5ml BGJ-Medium befüllten, 2ml Eppendorf-Cup aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1600 U/min. Der Überstand wurde abgesaugt und der Eppendorf-Cup mit 1ml PBS befüllt. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS homogenisiert und auf Eis gelagert (4°C).

Arbeitsschritt für die spätere Bestimmung der alkalischen Phosphatase

80% (800µl) der homogenisierten Zellsuspension wurden bei 1600 U/min 10 min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 0,5ml Lyse-Puffer aufgenommen und 30 min. auf Eis homogenisiert. Anschließend erfolgte die nochmalige Zentrifugation bei 14000 U/min für weitere 10 min. Der Überstand wurde diesmal in einen neuen Eppendorf-Cup überführt und bis zur weiteren Bestimmung bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der AP erfolgte mittels eines ELISA-Assays (Prinzipbeschreibung siehe 3.8.).

3.6. Histologie

3.6.1. Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen

Die Sehnen wurden nach Ausscheiden aus der Versuchsreihe in Histologie-Einbettkästen gelagert, katalogisiert und in frisch angesetztem Paraformaldehyd für 24h bei 4-6°C fixiert. Anschließend erfolgte die Wässerung durch fließendes Leitungswasser für 24h. Hiernach durchlief die Sehne die aufsteigende Alkoholreihe, wobei die Sehnen für je 24 Stunden in 70%igen, 80%igen, 90%igen und 100%igen Alkohol belassen wurden. Im Anschluss wurden die Sehnen mit Xylol inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Xylol gewechselt und die Sehnen für weitere 24 Stunden in diesem belassen. Im Anschluss wurden die Sehnen für 24 Stunden in Xylol-Technovit inkubiert, mit anschließendem Wechsel in frisches Xylol-Technovit, für weitere 24 Stunden. Hiernach wurden die Sehnen mittels verschiedener Lösungen, mit einer Liegezeit von je 24 Stunden pro Lösung (Präinfiltrations-Lsg. I und. II sowie Infiltrations-Lsg. I und II), fixiert.

3.6.2. Einbettung der Sehnen

Zwecks der Einbettung erfolgte vorher die Zubereitung der Einbettlösung, bestehend aus Stock-A und Stock-B Lösung (Zusammensetzung siehe S.38 Lösungen und Reagenzien). Die Sehnen wurden aus der Infiltrations-Lsg. II entnommen und aus den Histologie-Einbettkästen in Einbettkammern platziert. Diese wurden katalogisiert und mit Einbettlösung vollständig gefüllt. Anschließend wurden die eingebetteten Sehnen für 10 min. in ein Vakuum überführt, um überschüssige Luft aus dem Harz herauszulösen. Danach wurden die Einbettkammern mit Polyethylen-Folie eingedeckelt und im Kühlschrank, bis zur vollständigen Aushärtung des Harzes, aufbewahrt.

3.6.3. Herstellung von histologischen Schnitten

Nach Polymerisation der eingebetteten Sehnen erfolgte die Herstellung histologischer Schnitte. Hierbei wurden am Hartschnittmikrotom Polycut E Schnitte mit einer Dicke von 5µm erstellt und auf Superfrost Plus Objektträger aufgebracht. Die auf den Objektträger aufgetragenen Schnitte wurden im Anschluss mit Polyethylen-Folie bedeckt und für mehrere Tage in den Wärmeschrank überführt.

3.6.4. Die Van Kossa-Färbung

Das Prinzip des histochemischen Nachweises von Calcium in Carbonaten oder Phosphaten mittels der Van Kossa-Färbung besteht darin, dass Calciumionen gegen Silberionen ausgetauscht werden und diese anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Hierbei werden mineralisierte Anteile des Knochengewebes schwarz und Mineralisationsgrenzen schwarz granuliert dargestellt. Durch diese Färbung sollten in diesem Versuch die Kalzifizierungsareale der Sehnen dargestellt und quantifiziert werden.

3.6.5. Die PAS-Alcianblau-Färbung

Die PAS-Alcianblau-Färbung stellt eine Methode zur Differenzierung saurer Glykosaminoglykanen und neutralen Polysacchariden dar. Die sog. PAS-Reaktion basiert darauf, dass durch die verwendete Perjodsäure bestimmte, hauptsächlich in Polysacchariden vorkommende Atomgruppen zunächst aufgespalten und daraufhin zu Aldehyden oxidiert werden. Die anschließende Detektion der gebildeten Aldehyde, mit fuchsin-schwefliger Säure (Schiff'sches Reagenz), führt zu einer deutlichen Rotfärbung. Die PAS-Reaktion umfasst den Nachweis von Polysacchariden, neutralen Glykosaminoglykanen, Muco- u. Glycoproteinen, Glykolipiden, ungesättigten Fettsäuren und Phospholipiden. Bei dieser Färbemethode stellt sich Osteoid blassrosa, mineralisiertes Gewebe blassrötlich, saure Glykosaminoglykane blaugrün, Zellkerne blau und sowohl Glykogen als auch Glycoproteine dunkel purpurrot dar. Durch diese Färbung sollten in diesem Versuch Regionen mit neuer Osteoid-Bildung und mineralisierte Gewebe der Sehnen dargestellt und quantifiziert werden.

<u>Van Kossa-Stain-Färbung</u>		<u>PAS-Alcianblau-Färbung</u>	
2-Methoxyethylacetat (Entblasten)	3 x 1h	2-Methoxyethylacetat (Entblasten)	3 x 20 min
Aceton	2 x 10 min.	absteigende Alkoholreihe	1 min.
Aqua dest.	2 x 5 min.	Aqua dest.	2 x 3 min.
Färbung mit Silbernitrat-Lsg. 5%	1 h	Einstellen in 3%ige Essigsäure	3 min.
Kurzes spülen mit Aqua dest	2 x 10 sec.	Färbung mit Alcianblau-Lsg.	2 h
Reduzierung in Natriumkarbonat-Formaldehyd	8 min.	Spülung mit Leitungswasser	5 min.
Spülen mit Aqua dest	10 min.	Einstellen in Perjodsäure	30 min.
Fixierung in Natriumthiosulfat	5 min.	Spülung mit Leitungswasser	5 min.
Spülen in Leitungswasser	15 min.	Einstellen in Schiff'sches Reag.	45 min.
Spülen mit Aqua dest	2 x 3 min.	Spülung mit Leitungswasser	10 min.
Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun	1 x 5 min.	Färbung mit Hämalaun	10 min.
Bläuen mit Leitungswasser	10 min.	aufsteigende Alkoholreihe	3 min.
Aufsteigende Alkoholreihe	3 min.	Dehydratisierung mit Xylol	2 x 3 min
Alkohol 100%	5 min.	Eindeckung mit Entellan	
Dehydratisierung mit Xylol	2 x 3 min.		
Eindeckung mit Entellan			
<u>Färbeergebnis:</u>		<u>Färbeergebnis:</u>	
mineralisierte Anteile Knochengewebe	schwarz	Osteoid	blassrosa
Mineralisationsgrenzen	schwarz (granuliert)	mineralisiertes Gewebe	blassrötlich
Zellkerne	dunkelrot	saure Glykosaminoglykane	blaugrün
		Glycoproteine	purpurrot
		Zellkerne	blau

Abb. 24: Färbanleitung zur histologischen Färbung mittels v. Kossa und PAS-Alcianblau

3.7. Rasterelektronenmikroskopie

3.7.1. Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen

Die Sehnen wurden nach Entnahme (s. S. 39) für 24h im Kühlschrank in Primärfixationslösung belassen. Anschließend erfolgte die Spülung mit REM-Puffer (s.S.40), 3 bis 5x10 min. Die Sekundärfixation erfolgte mittels folgender Schritte: 4 h in Osmiumtetroxid, 10 x Spülung mit Aqua dest., aufsteigende Alkoholreihe (70%-100%) 2 h/Alkohol, 2 bis 3 x Spülung mit Aceton 2 h/Aceton. Beim letzten Spülgang wurden die Sehnen im Aceton belassen und in die Critical point Kammer überführt.

3.7.2. Critical Point Kammer und Sputter coater

Critical Point Kammer

Die sekundärfixierten, entwässerten Proben wurden einzeln in die Critical Point Kammer (BAL-TEC GmbH, 58454 Witten) überführt und dort mittels CO₂ getrocknet. Hierzu wurde die Trocknungskammer solange mit 100%igem Aceton aufgefüllt, bis die Proben gerade mit

Aceton bedeckt waren. Über CO₂ wurde die Trocknungskammer auf 0-5°C abgekühlt. Es entstand ein Aceton-CO₂-Gemisch, welches einen Druck von 50-52 Torr aufwies und in dem die Proben für 15-20 Minuten belassen wurden, bis Aceton-CO₂-Gemisch abgelassen wurde. Dieser Vorgang wurde ca. 5-6 x wiederholt, bis beim Ablassen des Aceton-CO₂-Gemisches nur noch CO₂-Kristalle und kein Aceton mehr abgeflossen sind. Für den letzten Schritt wurde CO₂ in die Trocknungskammer gefüllt, die Heizung eingeschaltet und die Probe allmählich erwärmt. Bei 31,1°C und 72,9 Torr war der kritische Punkt erreicht. Das in der Trocknungskammer verbliebene CO₂ wurde über einen Zeitraum von 10-15 Minuten abgelassen, die getrockneten Proben aus der Trocknungskammer entnommen und auf einen Aluminiumblock mit LeitC-Folie aufgebracht.

Sputter coater

Die auf LeitC-Folie aufgeklebten Proben wurden im Anschluss in den Sputter coater überführt. Dort wurde ein Vakuum erzeugt und das noch in der Kammer verbleibende Luftgemisch mit Argon über mehrere Spülgänge ausgetauscht. Nach Erreichen eines kompletten Vakuums wurden die Proben abschließend mit 20mA für 90 Sekunden mit Gold bedampft. Die mikroskopische Untersuchung und die Aufnahme von rasterelektronenmikroskopischen Bildern erfolgten mittels REM JSM-7500 F.

3.8. Analytbestimmung aus dem Haupt- und Zusatzversuch

Alle gewonnenen Proben wurden bis zu ihrer Bestimmung tiefgefroren aufbewahrt. Die Mediumüberstände aus dem Haupt- und Zusatzversuch wurden bei -80°C tiefgefroren. Aus ihnen wurden AP, LDH, Lactat und OCN bestimmt. Aus den Zelllysaten des Hauptversuchs wurde die AP bestimmt und diese Proben bei -20°C aufbewahrt. Die Mediumüberstände des Zusatzversuches wurden ebenfalls bei -80°C tiefgefroren. Aus ihnen wurden AP, LDH und Lactat bestimmt. Aus den Zelllysaten des Zusatzversuches wurde der Gehalt der AP ermittelt und diese Proben bei -20°C tiefgefroren.

3.8.1. Bestimmung von AP, Lactat, LDH und OCN mittels ELISA-Assays

Diese vier Analyte wurden aus den Mediumüberständen des Haupt- und Zusatzversuchs bestimmt (mit Ausnahme von OCN, Bestimmung nur aus MÜ des Hauptversuchs). Ebenfalls

mit dieser Methode wurde die AP aus den Zelllysaten des Haupt- und Zusatzversuchs bestimmt.

Die Ergebnisse der Analyte AP, LDH und Lactat wurden mittels der unten aufgeführten Enzym-Assay Kits bestimmt, mit freundlicher Unterstützung der Abteilung für Klinische Chemie Marburg und Herrn PD Dr. Stief. Die OCN Bestimmung erfolgte durch die Arbeitsgruppe selbst.

AP-ELISA-Assay

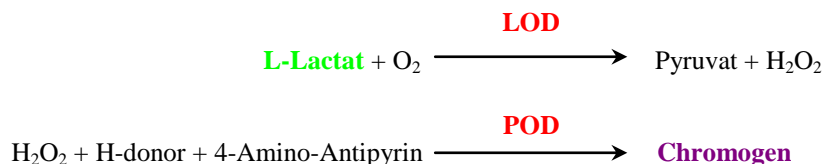
Dieser ELISA-Assay misst die Aktivität der AP über die Freisetzungsreaktion von freiem pNA aus pNA-Phosphat, was zu einer Gelbfärbung der Proben.



Das entstandene pNA wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. 40µl Probe oder Standards wurden mit 200 µl Reagenz 1 und mit 50 µl 20 mM p-Nitrophenylphosphat (pNA-Phosphat) in F-wells (NUNC) für 30 min. inkubiert und anschließend bei 23°C und einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Messung erfolgte über ein Microtiterplatten Photometer (Milenia, DPC, Los Angeles, USA). Die Standards waren Lyphochek[®] Level 1 und Level 2 (BioRad, Irvine, USA). Beide wurden im Verhältnis 1:4 mit 0.9% NaCl verdünnt und enthielten eine AP-Konzentration von 21.3 U/l (Level 1) und 75 U/l (Level 2) AP.

Lactat-ELISA-Assay

Der Lactat-ELISA-Assay (Trinder-Reaktion) von Roche misst den Lactatgehalt über die Oxidationsreaktion, katalysiert durch die Lactatoxidase (LOD) von Lactat zu Pyruvat. Das dabei gebildete H₂O₂ wird von der Peroxidase (POD) genutzt, um das farblose 4-Amino-Antipyrin zu einem violetten Chromogen zu oxidieren.



Die Intensität des gebildeten Chromogens ist direkt proportional zur Konzentration von Lactat aus der Probe oder dem Standard. 2µl Probe oder Standard wurden mit 200µl Reagenz 1 für 5 min. bei 23°C in Polystyren F-wells/96well plates (NUNC, Wiesbaden, Germany) inkubiert. Anschließend wurden 50µl Reagenz 2 hinzugegeben und nach 5 min bei 23°C der Anstieg des Absorptionsgrades bei (ΔA) 405 nm mit Hilfe eines Microtiterplatten Photometers

(Milenia; DPC, Los Angeles, USA) gemessen. Die Standards waren Lyphochek[®] Level 1 (4.22 mM Lactat) und Level 2 (1.11 mM Lactat)(BioRad, Irvine, USA).

LDH-ELISA-Assay

Der Lactatdehydrogenase (LDH) ELISA-Assay (Warburg-Reaktion) von Roche Diagnostics misst die LDH-Aktivität von Proben und Standards über den Protonen Transfer von L-Lactate auf NAD⁺.



Das gebildete NADH + H⁺ wird bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. 40µl Probe oder Standard wurden mit 200µl Reagenz 1 und mit 50µl Reagenz 2 in F-wells/96well plates (NUNC) inkubiert und nach 60 min bei 23°C mittels eines Microtiterplatten Photometers (Tecan Sunrise, Crailsheim, Germany) gemessen. Die Standards waren Lyphochek[®] Level 1 and Level 2 (BioRad, Irvine, USA). Beide Standards wurden im Verhältnis 1:4 mit 0.9% NaCl verdünnt und enthielten eine LDH-Konzentration von 40.3 U/l (Level 1) und 80 U/l LDH (Level 2).

Osteocalcin-ELISA-Assay

Der Osteocalcin-ELISA-Assay von Quidel[®] Corporation ist ein kompetitiver Immunoassay, der unter Zugabe von Maus-Anti-Osteocalcin-Antikörper, Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat und pNPP-Substrat den OCN-Gehalt quantifiziert. Auf einer 96well Platte wurden 25µl Probe und Standards aufgetragen, mit 125µl anti-OCN (monoklonaler-anti-OCN-Ak) befüllt und 120 min. inkubiert. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen mit Waschpuffer, die Applikation von 150µl Enzym-Konjugat (anti-Maus-IgG-Ak) und eine weitere Inkubation von 60 min. Nach einem erneuten Waschen der Wells mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe von 150µl Substrat-Lösung (p-Nitrophenyl-Phosphat, Diethanolamin, Magnesiumchlorid-Lsg. und 0,05% Natriumazid). Die Inkubationszeit in dieser Phase betrug 35-40 Minuten. Sie endete mit der Zugabe von 50µl Stop-Lösung (0,5N NaOH) und der Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines Microtiterplatten Photometers.

3.9. Fotodokumentation

Parallel zu den MW erfolgte eine mikroskopische Beurteilung des Wachstumverhaltens der Zellkulturen und eine exemplarische Dokumentation mit Hilfe mikroskopisch, digitaler

Photographien über die Dichte bzw. Konfluenz des Zellrasens, das Aussehen der Zellen und etwaige Kontaminationen des Mediums mit Bakterien oder Pilzen. Hierzu wurde eine Leica DC300 genutzt und die Bilder mittels der Software Image Pro Plus 6.2. aufbereitet.

3.10. Statistik

Es wurden 60 Zellkulturlinien mit insgesamt 476 Messgruppen ($2 < n < 10$) mit 1318 paarweisen Signifikanztests analysiert.

Typische Ausreißer wurden bei allen 476 Messgruppen mit einem konventionellen Ausreißertest (1,5-fache des Interquartilsabstands) überprüft und ggfs. eliminiert.

Signifikanztests wurden mittels MATLAB mit einem Zweistichproben-t-Test für abhängige (Tab.4-7) Stichproben, in allen anderen Vergleichen mit einem Zweistichproben-t-Test für unabhängige Daten durchgeführt ($p < 0,05$).

Die statistischen Analysen erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Dr. Thomas Wiebringhaus (Westfälische Hochschule, Recklinghausen).

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse des Hauptversuches aus den Mediumüberständen

4.1.1. Ergebnisse aus der Bestimmung der AP

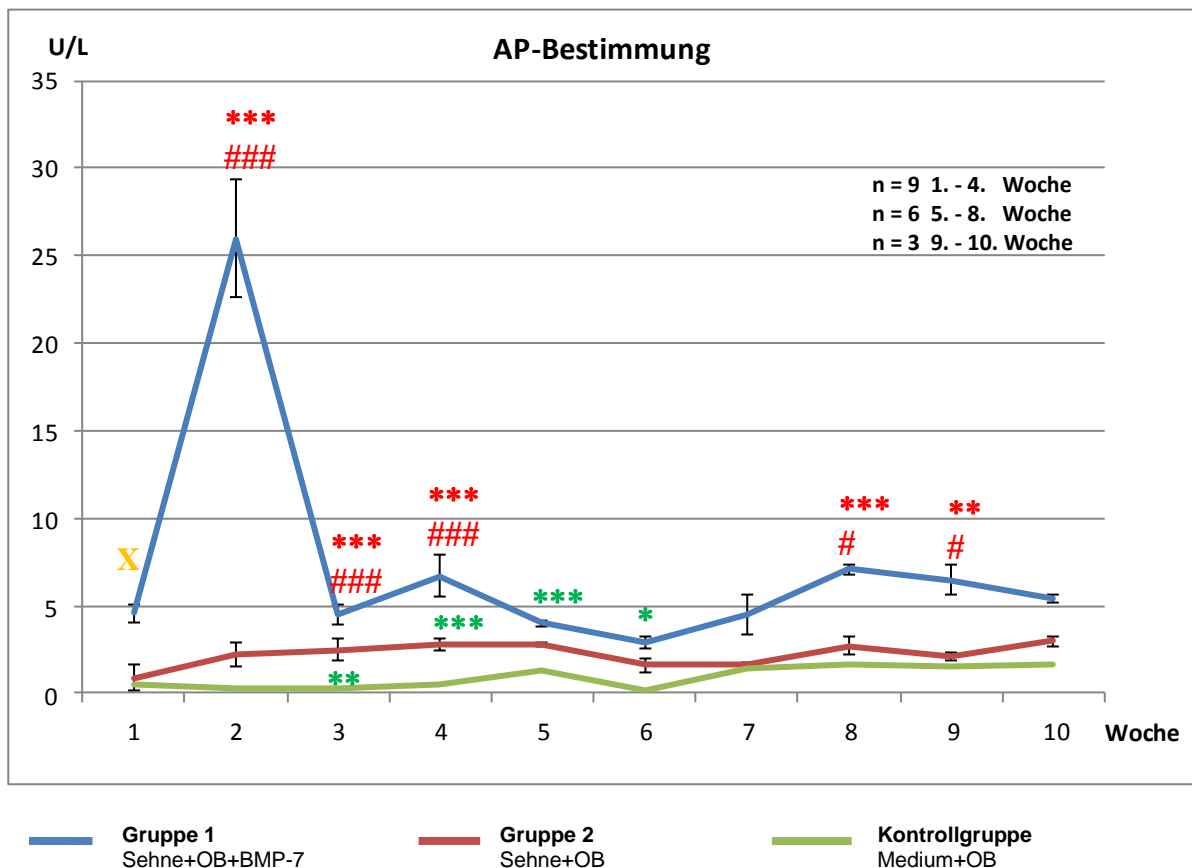


Abb. 25: **AP-Bestimmung** der **Gruppen 1 und 2** über **10 Wochen**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2:	(**) p < 0,01	Gruppe 2 vs. Kontrolle: (*) p < 0,05
	(***) p < 0,001	(**) p < 0,01
Gruppe 1 vs. Kontrolle:	(#) p < 0,05	(***) p < 0,001
	(###) p < 0,001	

Die Abb. 25 zeigt den Verlauf der AP-Aktivität der Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7) und Gruppe 2 (Sehne+OB) im Mediumüberstand über einen Zeitraum von 10 Wochen. Zu erkennen ist ein signifikanter AP Anstieg der Gruppe 1 ab der Woche 2 um ca. das Sechsfache (p-Wert: 1,32E-14).

Im Vergleich zur Gruppe 1 ist der AP-Gehalt der Gruppe 2 über die gesamte Laufzeit nahezu konstant, bei einem Mittel um ca. 2 U/l. Die AP-Aktivität der Gruppe 1 weist nach einer Abnahme um das Sechsfache in der Woche 3 eine kontinuierliche Zu- und Abnahme auf,

quasi einen wellenförmigen Verlauf. Der AP-Spitzenwert von Woche 2 wird während der ganzen Laufzeit nicht mehr erreicht.

Die Kontrolle zeigt im Vergleich zur Gruppe 1 und 2 einen niedrigen, konstanten AP-Gehalt.

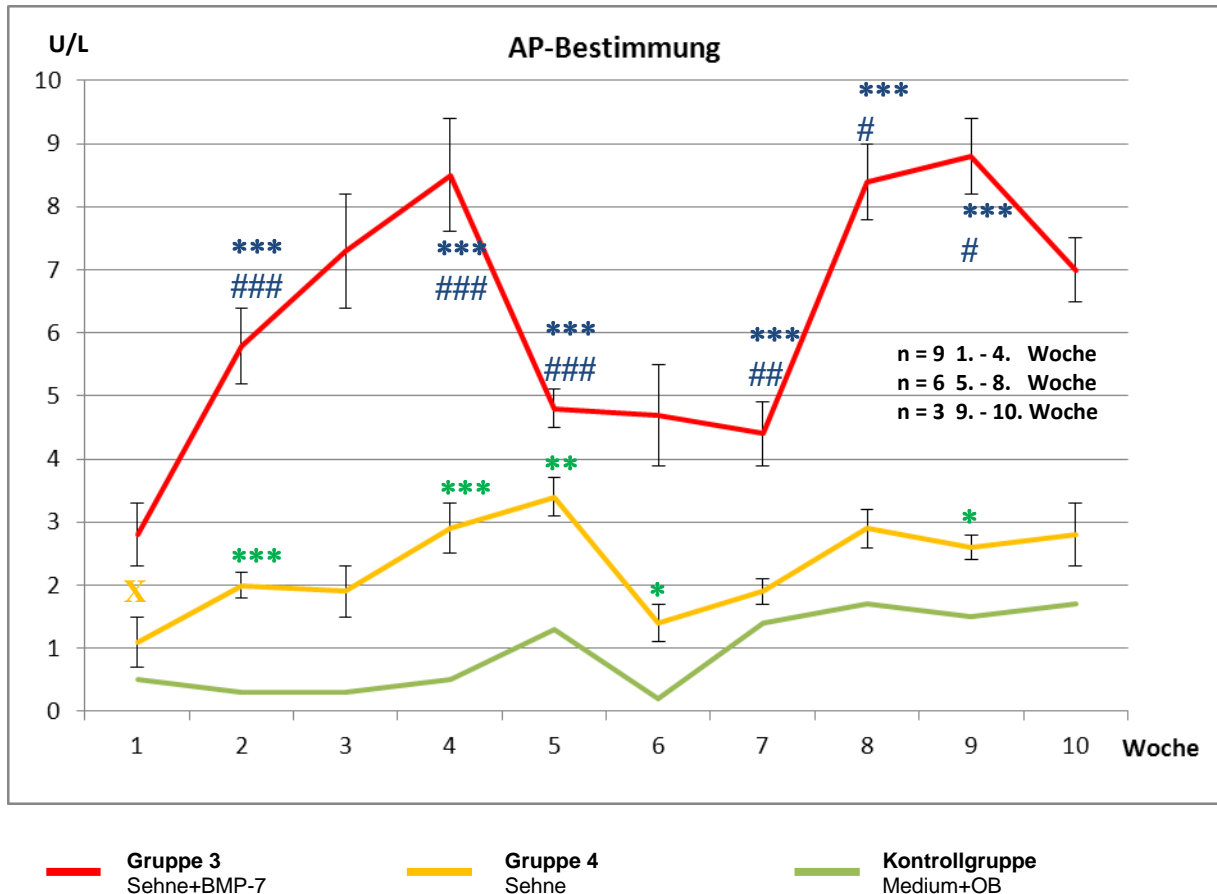


Abb. 26: **AP-Bestimmung** der **Gruppen 3 und 4** über **10 Wochen**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 3 vs. 4: (***) $p < 0,001$

Gruppe 3 vs. Kontrolle: (#) $p < 0,05$

(##) $p < 0,01$

(###) $p < 0,001$

Gruppe 4 vs. Kontrolle: (*) $p < 0,05$

(**) $p < 0,01$

(***) $p < 0,001$

In der Abb. 26 ist der AP-Gehalt der Gruppen 3 (Sehne+BMP-7) und 4 (Sehne) im Verlauf von 10 Wochen dargestellt. Zu erkennen ist ein Aktivitätsunterschied zwischen Gruppe 3 und 4 über den gesamten Versuchszeitraum.

Innerhalb der ersten zwei Wochen, weist die AP-Aktivität der Gruppe 3 einen signifikanten Anstieg um mehr als die Hälfte auf ($p < 0,001$) und verdreifacht sich im weiteren Verlauf, ausgehend von der 1. Woche, bis zum Erreichen des ersten Spitzenwertes Ende der 4. Woche ($p < 0,001$). Im Anschluss daran nimmt die AP-Aktivität bis zur 5. Woche um fast die Hälfte wieder ab und verbleibt für weitere zwei Wochen nahezu konstant auf einem niedrigeren Aktivitätsniveau. Ende der 8. Woche hat sich die AP-Aktivität, ausgehend von der 7. Woche,

nahezu wieder verdoppelt ($p < 0,05$). Zum Versuchsende ist die AP-Aktivität um ca. 16% gefallen, aber dennoch 2,5-fach höher, als der Ausgangswert.

Gruppe 4 hat innerhalb der ersten Wochen, im Vergleich zur Gruppe 3, einen vergleichsweise konstanten Anstieg, mit einer signifikanten Verdreifachung der AP-Aktivität in der 5. Woche ($p < 0,01$), ausgehend von der 1. Woche. Im Anschluss daran sinkt die AP-Aktivität fast auf Ausgangsniveau und steigt danach kontinuierlich wieder an. Im ganzen Verlauf ist die AP-Aktivität jedoch deutlich niedriger als die der Gruppe 3.

Die Kontrolle zeigt im Vergleich zur Gruppe 3 und 4 einen niedrigen, konstanten AP-Gehalt.

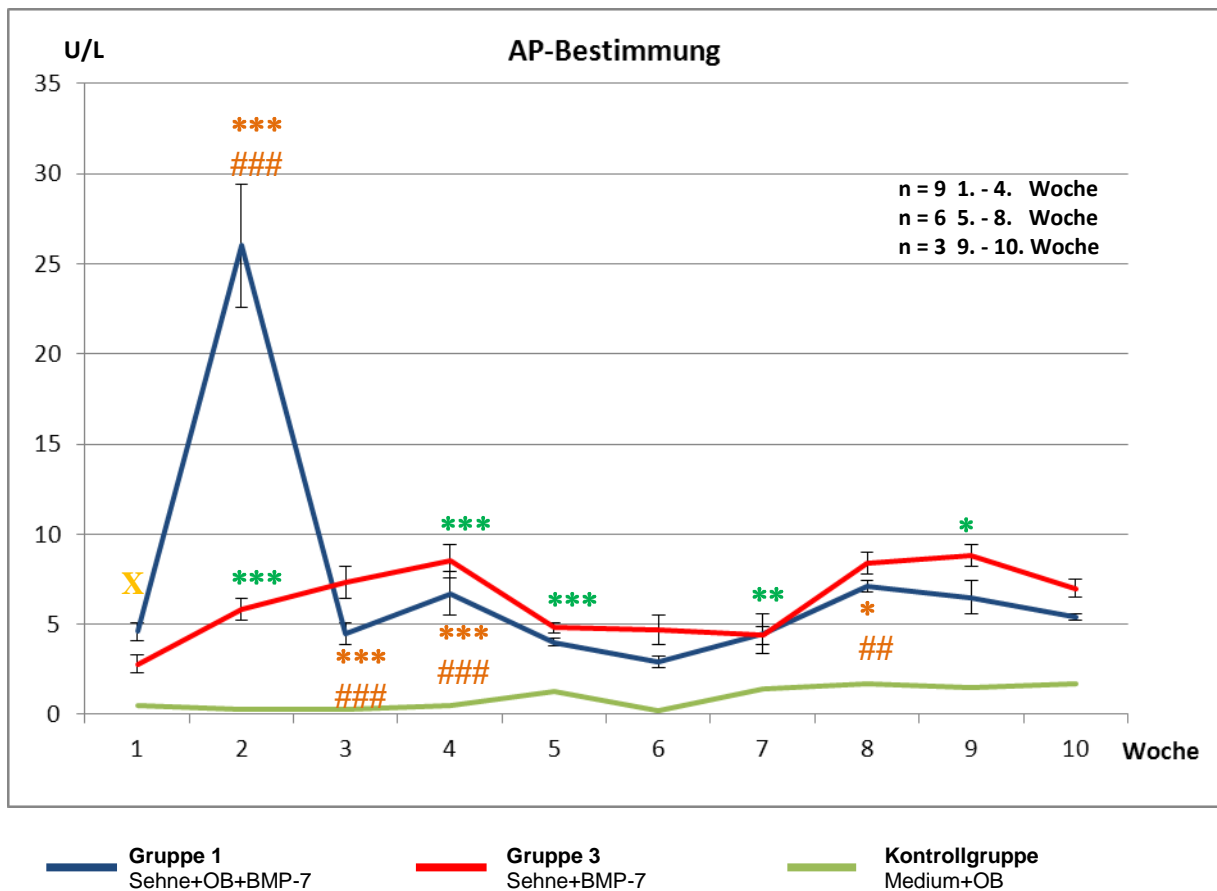


Abb. 27: **AP-Bestimmung** der Gruppen **1 und 3** über **10 Wochen**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 3: (*) $p < 0,05$
(**) $p < 0,01$
(***) $p < 0,001$

Gruppe 1 vs. Kontrolle: (##) $p < 0,01$
(###) $p < 0,001$

Gruppe 3 vs. Kontrolle: (*) $p < 0,05$
(**) $p < 0,01$
(***) $p < 0,001$

Die Abb. 27 gibt den Verlauf der beiden Gruppen mit einer BMP-7 Applikation (Gruppe 1 und Gruppe 3) wieder. Der Verlauf dieser Gruppen ist im Wesentlichen gleich. Beide zeigen in etwa einen wellenartigen Verlauf, wobei die AP-Aktivität der Gruppe 3, ab der 3. Woche jedoch im Schnitt um 26%, stets etwas höher liegt.

Der einzige wesentliche Unterschied der beiden Gruppen besteht in der 2. Woche. Hier weist die AP-Aktivität der Gruppe 1 einen signifikanten Anstieg um das Sechsfache auf (p-Wert: 3,65E-13). Ausgehend von der AP-Aktivität der Gruppe 3 der 1. Woche, zeigt sich sogar ein Anstieg um das Neunfache.

Die Kontrolle zeigt im Vergleich zur Gruppe 1 und 3 einen niedrigen, konstanten AP-Gehalt.

4.1.2. Ergebnisse aus der Bestimmung von Lactat und LDH

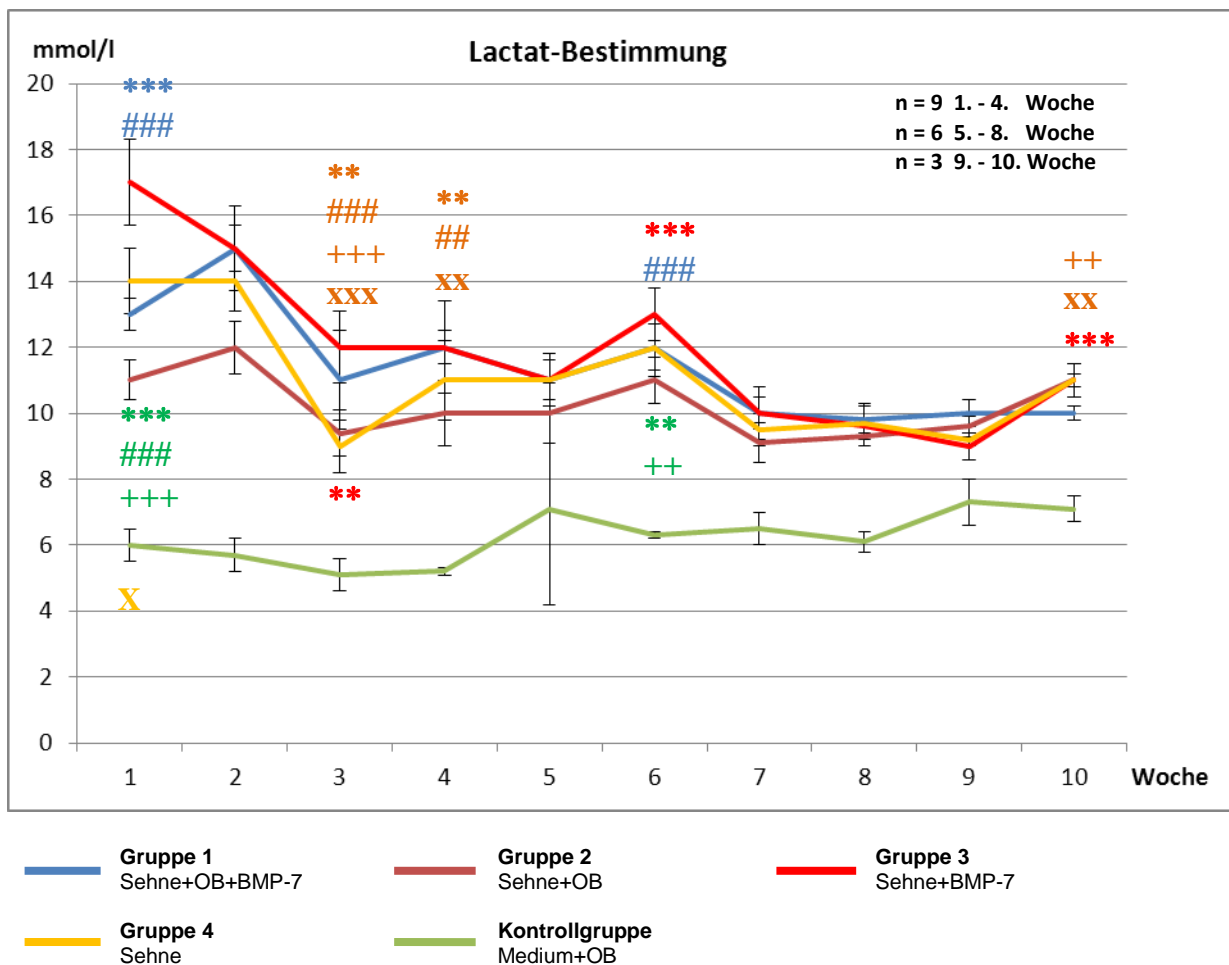


Abb. 28: **Lactat-Bestimmung** der **Gruppen 1 bis 4** und der **Kontrollgruppe** über **10 Wochen**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X). Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2:	(**) p < 0,01 (***) p < 0,001	Gruppe 2 vs. 3:	(**) p < 0,01 (***) p < 0,001
Gruppe 1 vs. 3:	(##) p < 0,01 (###) p < 0,001	Gruppe 2 vs. 4:	(###) p < 0,001
Gruppe 1 vs. 4:	(++) p < 0,01 (+++ p < 0,001	Gruppe 2 vs. Kontrolle:	(++) p < 0,01 (+++ p < 0,001
Gruppe 1 vs. Kontrolle:	(xx) p < 0,01 (xxx) p < 0,001	Gruppe 4 vs. Kontrolle:	(**) p < 0,01 (***) p < 0,001
Gruppe 3 vs. 4	(***) p < 0,001		
Gruppe 3 vs. Kontrolle:	(###) p < 0,001		

In der Abb. 28 ist der Lactatgehalt aller Gruppen und der Kontrollgruppe aufgezeigt. Die Lactatwerte liegen hierbei im Durchschnitt während der gesamten Versuchslaufzeit zwischen 9 und 13 mmol/l. Werte über 18 mmol/l werden in der gesamten Zeit nicht erreicht. In den ersten drei Wochen sind die Lactatwerte bei allen Versuchsgruppen am höchsten, mit einem Durchschnittswert von 12,5 mmol/l. Wobei hierbei die Gruppe 3 (Sehnen+OB+BMP-7) die höchsten Werte aufweist.

In den letzten vier Wochen, sind die Lactatwerte nahezu konstant, bei einem Mittel um 9,5 mmol/l. Damit jedoch auch deutlich niedriger, im Schnitt ca. 22%, als zu Beginn des Versuches.

Zudem weisen die Versuchsgruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen höheren Lactatgehalt über die gesamte Versuchslaufzeit auf. Die Kontrollgruppe liegt dabei im Mittel um einen Lactatgehalt von ca. 6 mmol/l.

Da alle Gruppen in der gesamten Versuchszeit keinen Lactatanstieg > 18 mmol/l aufgewiesen haben, lagen alle Gruppen im Bereich der für einen in-vitro-Versuch optimalem Medium-pH. Im Vorhinein war es daher das Ziel, die Lactatwerte so niedrig wie möglich zu halten, da mittels eines MTT-Tests bekannt war, dass bei Werten über 24 mmol/l die Zellen absterben.

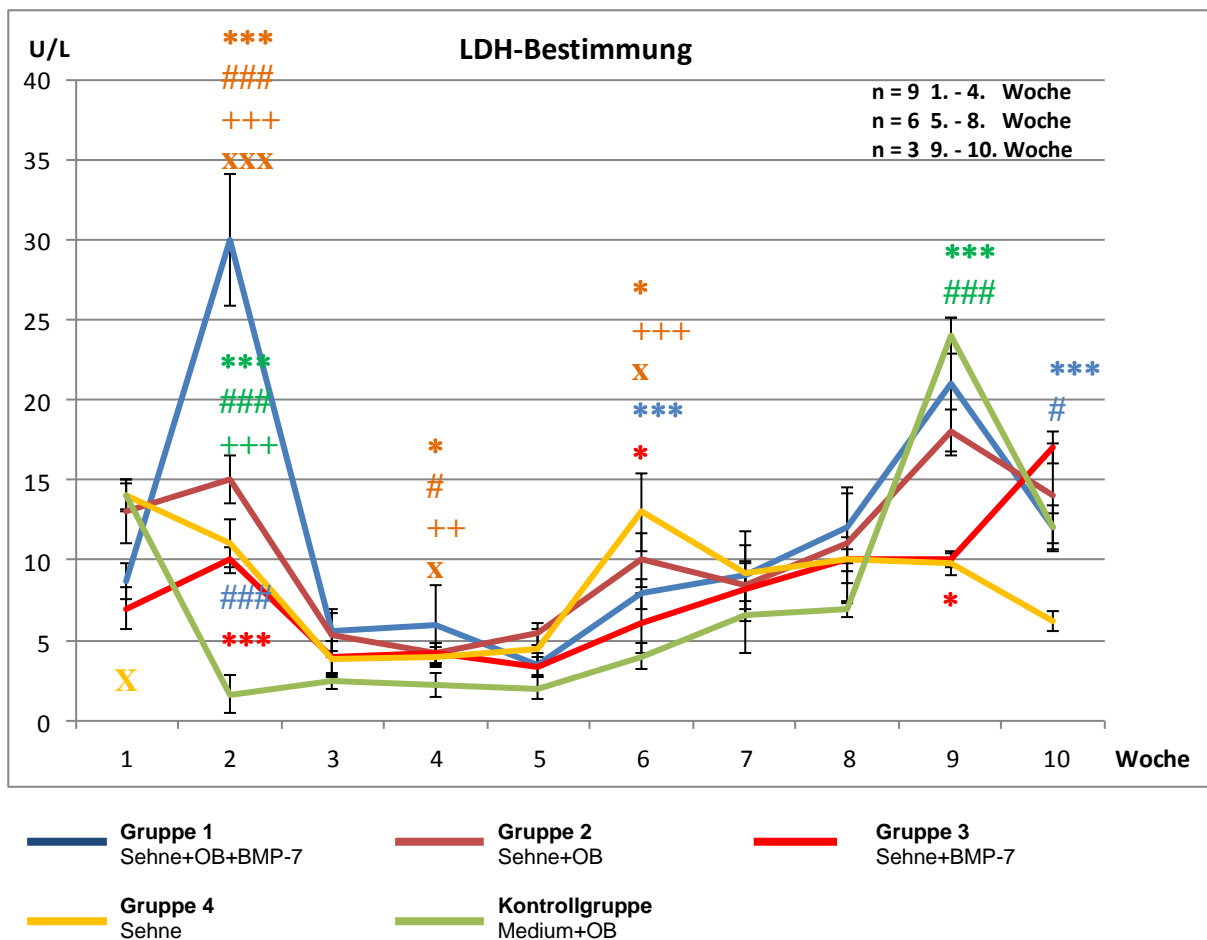


Abb. 29: **LDH-Bestimmung** der **Gruppen 1 bis 4** und der **Kontrollgruppe** über **10 Wochen**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X). Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2:	(*) p < 0,05	Gruppe 2 vs. 3:	(***) p < 0,001
	(***) p < 0,001	Gruppe 2 vs. 4:	(###) p < 0,001
Gruppe 1 vs. 3:	(#) p < 0,05	Gruppe 2 vs. Kontrolle:	(+++ p < 0,001
	(###) p < 0,001		
Gruppe 1 vs. 4:	(+) p < 0,05	Gruppe 3 vs. 4	(***) p < 0,001
	(++) p < 0,01	Gruppe 3 vs. Kontrolle:	(#) p < 0,05
	(+++ p < 0,001		(###) p < 0,001
Gruppe 1 vs. Kontrolle:	(x) p < 0,05		
	(xxx) p < 0,001	Gruppe 4 vs. Kontrolle:	(*) p < 0,05
			(***) p < 0,001

Die Abb. 29 gibt den LDH-Gehalt aller Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum wieder. Grob zusammengefasst zeigen alle Gruppen mit zellulärer Aktivität (Gruppe 1-4) einen wechselnden Verlauf, mit Zu- und Abnahme der LDH-Aktivität. Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7) z.B. weist in der 2. Woche einen starken signifikanten Anstieg um das Dreifache auf ($p < 0,001$), fällt jedoch im Anschluss unterhalb des Ausgangswertes ab. Im weiteren Verlauf nimmt die LDH-Aktivität allerdings weiter zu, mit einer zweiten Aktivitätsspitze in der 9. Woche. Ausgehend von Woche 5, mit der niedrigsten LDH-Aktivität, ist das ein Anstieg um das Sechsfache. Von Woche 9 auf 10 sinkt die LDH-Aktivität wiederum um fast die Hälfte.

In der Gruppe 2 (Sehne+OB) nimmt bereits nach der 2. Woche die LDH-Aktivität um fast das Dreifache ab und weist bis zur 5. Woche eine weiterhin geringe Aktivität auf. In der 6. Woche kommt es dann zu einem Anstieg um ca. 85%, mit einer im weiteren Verlauf zunehmenden Tendenz, bis zum Erreichen einer Aktivitätsspitze in der 9. Woche, ca. 38% höher als der Ausgangswert. Zum Versuchsende nimmt die LDH-Aktivität um ca. 22% ab.

Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) weist im Ganzen eine niedrigere LDH-Aktivität auf, als Gruppe 1 und 2, im Schnitt ca. 30 % geringer, ist aber, was den Verlauf angeht, der Gruppe 2 sehr ähnlich. Die maximale LDH-Aktivität wird erst bei Versuchsende erreicht und beträgt ca. das 2,4-fache des Ausgangswertes ($p < 0,05$).

Bei der Gruppe 4 (Sehne) sinkt nach der 1. Woche die LDH-Aktivität um ca. 21% ab und verbleibt während der 3. bis 5. Woche konstant niedrig. Erst in der 6. Woche kommt es wieder zu einer Aktivitätszunahme um ca. das Dreifache, ausgehend von Woche 5 ($p < 0,05$). Jedoch wird die Ausgangsaktivität von 14 U/l aus der 1. Woche nicht mehr überschritten. Bis zum Versuchsende kommt es zu einer stetigen Abnahme der LDH-Aktivität um mehr als die Hälfte, ausgehend vom Ausgangswert der 1. Woche.

In der Kontrollgruppe kommt es zu einem Abfall der LDH-Aktivität nach der 1. Woche um fast das Neunfache, mit einer anschließenden konstant niedrigen Aktivität von der 2. bis zur 5. Woche. Ab der 6. Woche beginnt eine stetige Aktivitätszunahme, mit einer Aktivitätsspitze in der 9. Woche und einer Zunahme der LDH-Aktivität um fast das Doppelte, ausgehend von Woche 1. Bei Versuchsende ist die LDH-Aktivität wiederum um die Hälfte verringert und unterhalb des Ausgangswertes gesunken.

4.1.3. Ergebnisse aus der Bestimmung von Osteocalcin

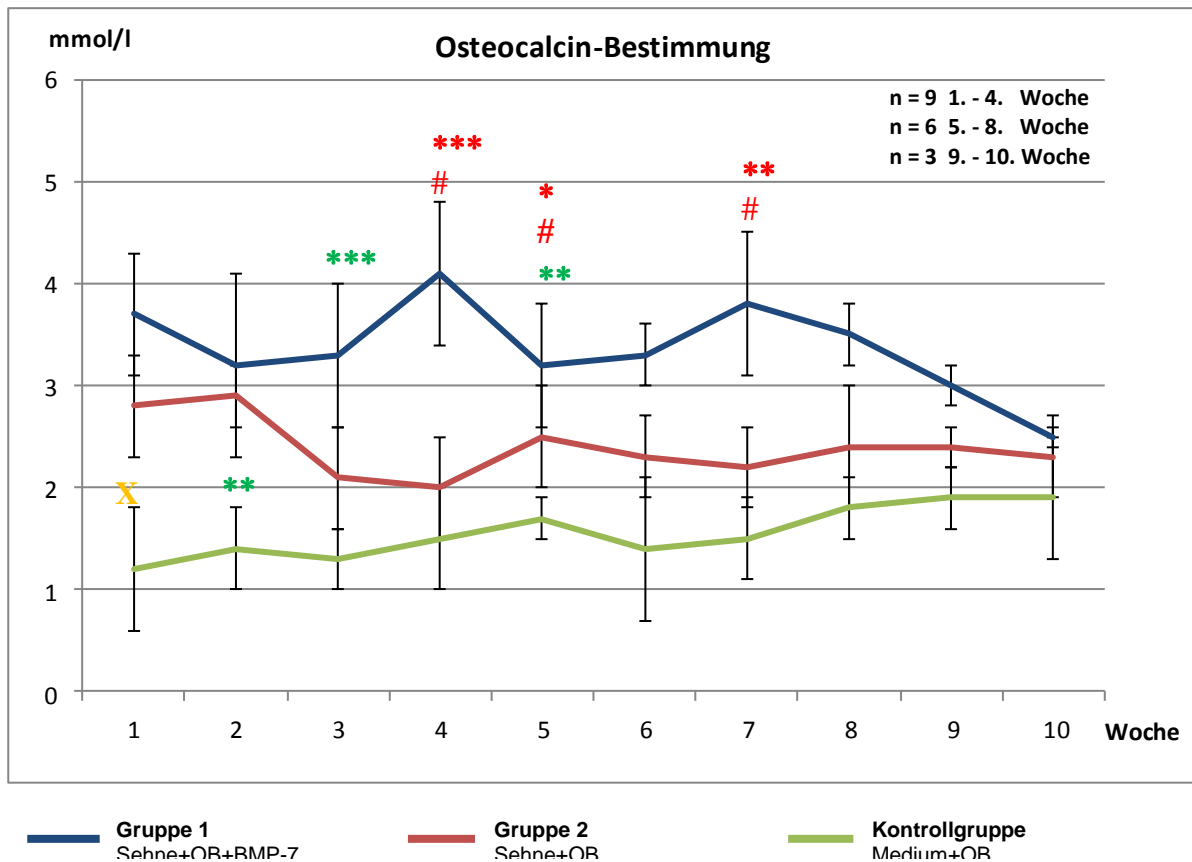


Abb. 30: **Osteocalcin-Bestimmung** der Gruppen 1 und 2 über 10 Wochen. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2:

(*) $p < 0,05$

(**) $p < 0,01$

(***) $p < 0,001$

Gruppe 2 vs. Kontrolle: (**) $p < 0,01$

(***) $p < 0,001$

Gruppe 1 vs. Kontrolle: (#) $p < 0,05$

Die Abb. 30 gibt den OCN-Gehalt der Gruppen 1 und 2 über den gesamten Versuchszeitraum wieder. Zu erkennen ist, dass der OCN-Gehalt der Gruppe 1 über den gesamten Verlauf höher ist, im Schnitt um ca. 29%, als der der Gruppe 2.

Die Konzentration der Gruppe 1 zeigt, ausgehend von der ersten Woche, zunächst einen Abfall der OCN-Konzentration um ca. 14%, steigt jedoch in den nächsten 2 Wochen kontinuierlich an und erreicht Ende der 4. Woche die erste, höhere OCN-Konzentration ($p < 0,05$). Diese ist, ausgehend von der zweiten Woche, um ca. 28% und ausgehend von der Ausgangskonzentration, um ca. 11% gestiegen. Im Anschluss daran fällt die Konzentration wiederum um ca. 22%, bis zur 5. Woche, ab. Im weiteren Verlauf ist eine erneute Konzentrationszunahme zu messen, die in der 7. Woche mit einer zweiten, größeren Konzentrationszunahme einhergeht (p -Wert $< 0,05$). Diese ist allerdings nur geringfügig höher (ca. 2,7%) als der Ausgangswert und übersteigt nicht den OCN-Gehalt der Woche 4. Während

der letzten drei Wochen nimmt die OCN-Konzentration kontinuierlich ab und ist bei Versuchsende um ca. 32% geringer, als die Ausgangskonzentration der Woche 1. In der Gruppe 2 kommt es, ausgehend von der 1. Woche, zu einer geringfügigen Konzentrationszunahme um ca. 3,5% Ende der 2. Woche. Im Anschluss daran nimmt der OCN-Gehalt für die nächsten zwei Wochen um ca. 30% ab und steigt erst Ende der 5. Woche wieder leicht an (25% von Woche 4). Danach weist die OCN-Konzentration bis zum Versuchsende einen konstant niedrigen Verlauf, bei einem Mittel um etwa 2,2 mmol/l, auf. Die Kontrolle zeigt einen niedrigeren OCN-Gehalt im Vergleich zur Gruppe 1 und 2 (ca. 60%/40%) und eine nur leicht ansteigende Konzentrationszunahme, mit einem Maximum in der 9. Woche (ca. 58% Zunahme gegenüber der Ausgangskonzentration). In der letzten Woche nimmt letztendlich der OCN-Gehalt um fast die Hälfte ab und ist damit unter die Ausgangskonzentration gesunken (ca. 17% gegenüber Woche 1).

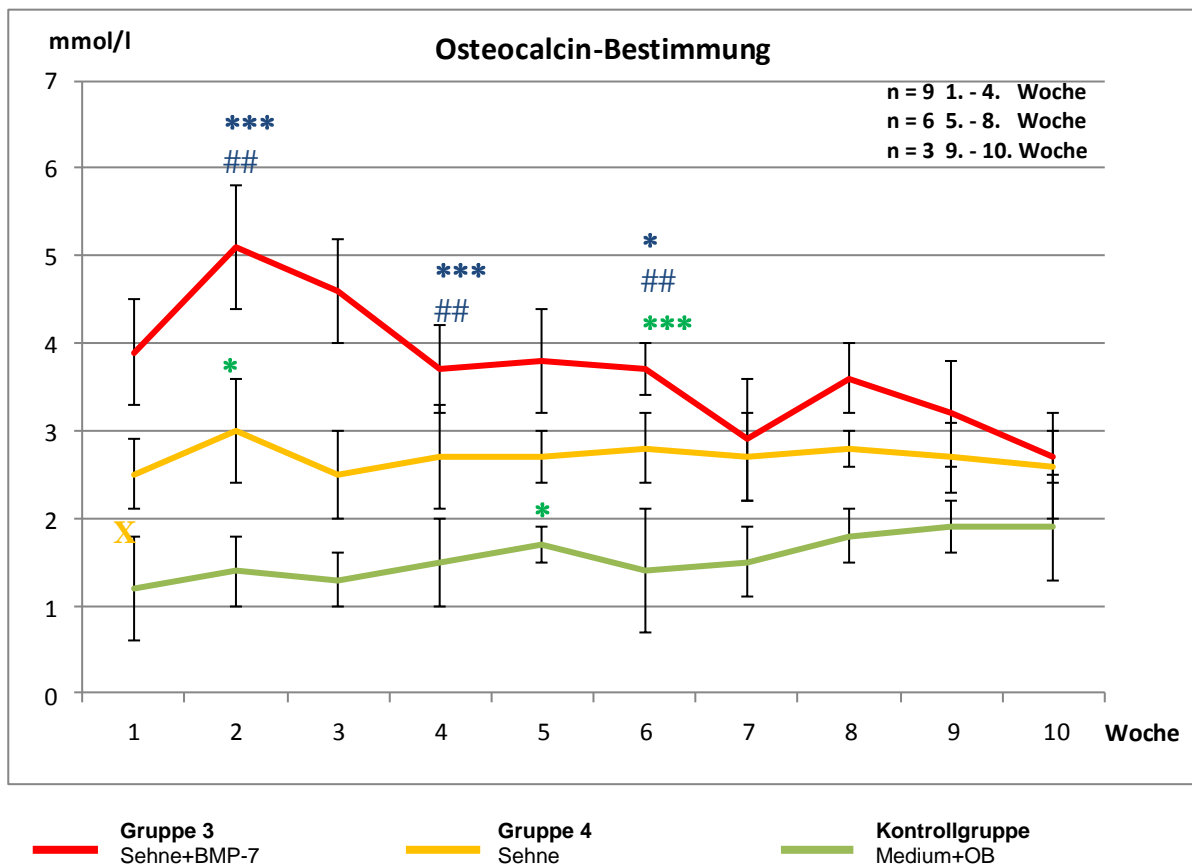


Abb. 31: **Osteocalcin-Bestimmung** der **Gruppen 3 und 4** über **10 Wochen**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 3 vs. 4: (*) $p < 0,05$

(***) $p < 0,001$

Gruppe 3 vs. Kontrolle: (##) $p < 0,01$

Gruppe 4 vs. Kontrolle: (*) $p < 0,05$

(***) $p < 0,001$

In Abb. 31 sind die OCN-Konzentrationen der Gruppen 3 und 4 aufgezeigt. Zu erkennen ist, dass der OCN-Gehalt der Gruppe 3 stets höher ist, im Schnitt ca. 37 %, als der der Gruppe 4. Die OCN-Konzentration der Gruppe 3 weist eine signifikante Konzentrationszunahme in der

2. Woche auf ($p < 0,05$), die ca. 31% der Ausgangskonzentration beträgt. Im Anschluss daran kommt es bis zur 7. Woche zu einer kontinuierlichen Konzentrationsabnahme, die ca. 25% niedriger als die Ausgangskonzentration ist. Im Verlauf der nächsten Woche nimmt der OCN-Gehalt zwar um ca. 24% wieder zu, steigt jedoch nicht mehr über die Ausgangskonzentration hinaus. Bis zum Versuchsende nimmt der OCN-Gehalt wieder stetig ab und ist Ende der 10. Woche um ca. 30% geringer, als in der 1. Woche.

Die Konzentration der Gruppe 4 weist zusammengefasst einen nahezu konstanten Verlauf, ohne nennenswerte Zu- oder Abnahmen der OCN-Konzentration, auf, mit einem Mittel um etwa 2,7 mmol/l. Einzig in Woche 2 kommt es zu einer Konzentrationszunahme um 20%, jedoch nimmt der OCN-Gehalt in Woche 3 um ca. 17% wieder ab.

Die Kontrolle zeigt einen niedrigeren OCN-Gehalt im Vergleich Gruppe 3 (ca. 60%) und Gruppe 4 (ca. 45%) und eine nur leicht ansteigende Konzentrationszunahme, mit einem Maximum in der 9. Woche (ca. 58% Zunahme gegenüber der Ausgangskonzentration). In der letzten Woche nimmt letztendlich der OCN-Gehalt um fast die Hälfte ab und ist damit unter die Ausgangskonzentration gesunken (ca. 17% gegenüber Woche 1).

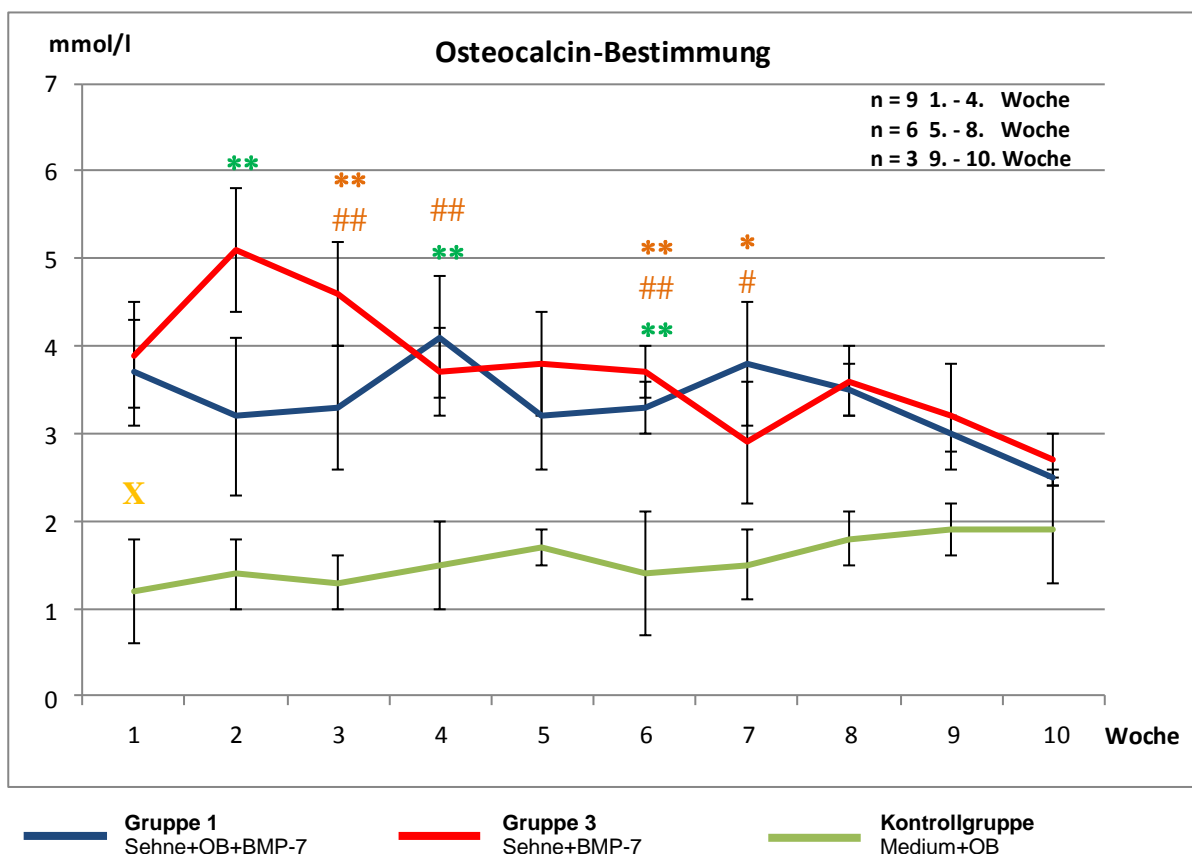


Abb. 32: **Osteocalcin-Bestimmung** der **Gruppen 1 und 3** über **10 Wochen**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 3: (*) $p < 0,05$

(**) $p < 0,01$

Gruppe 1 vs. Kontrolle:

(#) $p < 0,05$

(##) $p < 0,01$

Gruppe 3 vs. Kontrolle: (**) $p < 0,01$

Die Abb. 32 gibt den Verlauf der OCN-Konzentration der Gruppen wieder, die eine BMP-7 Applikation erhalten haben (Gruppe 1 und 3). Zu erkennen ist, dass beide Kurven im Durchschnitt etwa den gleichen Verlauf und den gleichen OCN-Gehalt aufweisen, wobei die OCN-Konzentration der Gruppe 1, im Schnitt um ca. 9%, stets etwas niedriger ist. Die wesentlichen Unterschiede zeigen sich in den ersten 4 Wochen. Während dieses Abschnitts weist der OCN-Gehalt der Gruppe 1, ausgehend von der ersten Woche, zunächst einen Abfall der OCN-Konzentration um ca. 14% auf. Der OCN-Gehalt steigt jedoch in den nächsten 2 Wochen kontinuierlich an und erreicht Ende der 4. Woche die erste, höhere OCN-Konzentration. Diese ist, ausgehend von der zweiten Woche, um ca. 28% und ausgehend von der Ausgangskonzentration, um ca. 11% gestiegen. Im Anschluss daran fällt die Konzentration wiederum um ca. 22%, bis zur 5. Woche, ab.

Die OCN-Konzentration der Gruppe 3 weist dagegen eine signifikante Konzentrationszunahme in der 2. Woche auf ($p < 0,01$), die ca. 31% der Ausgangskonzentration beträgt. Im Anschluss daran kommt es bis zur 7. Woche zu einer kontinuierlichen Konzentrationsabnahme, die ca. 25% niedriger als die Ausgangskonzentration ist.

Die Kontrolle zeigt einen niedrigeren OCN-Gehalt im Vergleich zur Gruppe 1 (ca. 60%) und Gruppe 3 (ca. 60%) und eine nur leicht ansteigende Konzentrationszunahme, mit einem Maximum in der 9. Woche (ca. 58% Zunahme gegenüber der Ausgangskonzentration). In der letzten Woche nimmt letztendlich der OCN-Gehalt um fast die Hälfte ab und ist damit unter die Ausgangskonzentration gesunken (ca. 17% gegenüber Woche 1).

4.2. Ergebnisse des Hauptversuchs aus der Zelllyse

4.2.1. Ergebnisse aus der Bestimmung der AP

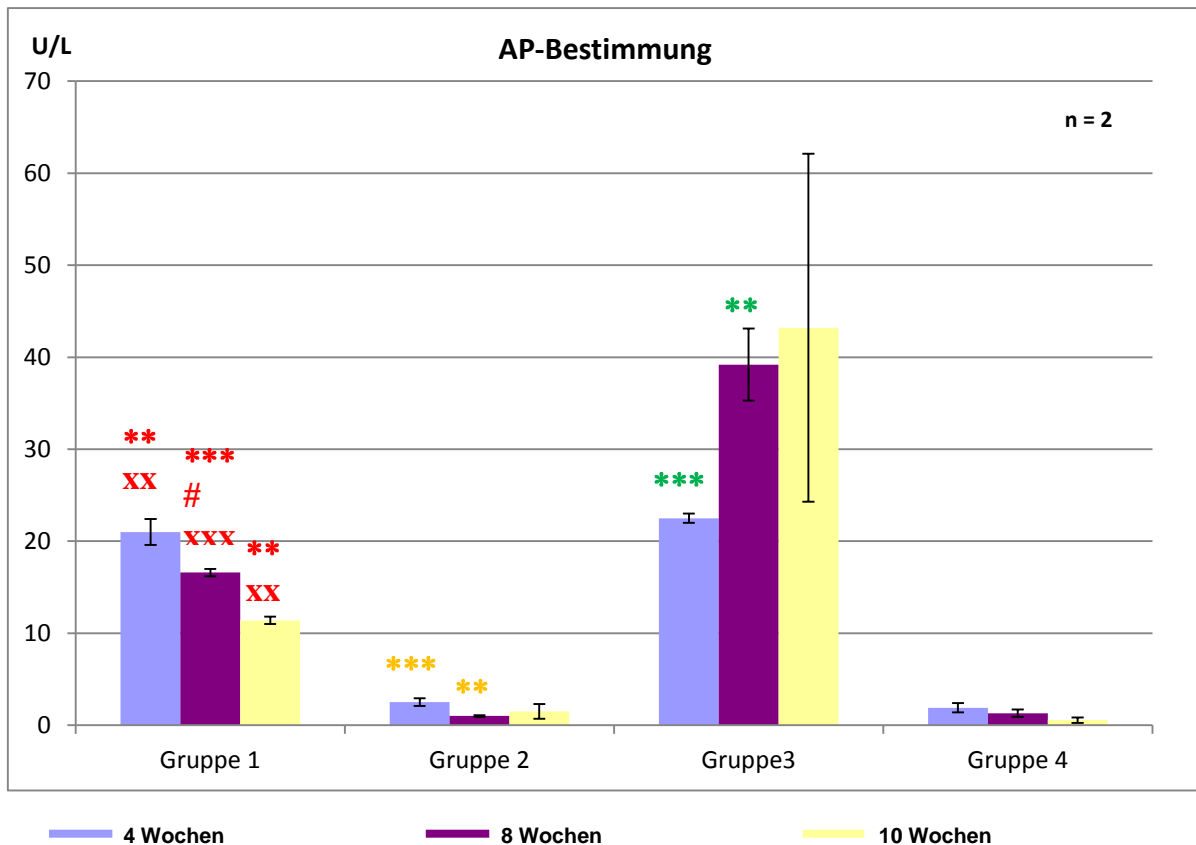


Abb. 33: **AP-Bestimmung** aus der Zelllyse. Dargestellt sind die Mittelwerte und +/- Standardabweichungen aller 4 Gruppen aus drei Monaten; **Gruppe 1:** Sehne+OB+BMP-7, **Gruppe 2:** Sehne+OB, **Gruppe 3:** Sehne+BMP-7, **Gruppe 4:** Sehne.

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2: (***) $p < 0,001$ Gruppe 2 vs. 3: (***) $p < 0,001$ Gruppe 3 vs. 4: (***) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 3: (#) $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. 4: (xxx) $p < 0,001$
 Gruppe 2 vs. 3: (**) $p < 0,01$ Gruppe 3 vs. 4: (**) $p < 0,01$

In der Abb. 33 ist die AP-Aktivität aller Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. Die Erhebungszeitpunkte waren der 1., 2. und 3. Monat.

Die Gruppen 1 und 3 waren die Gruppen, die eine BMP-7 Applikation erhalten haben. Zu erkennen ist, dass diese Gruppen während der 3 Erhebungspunkte eine stets höhere AP-Aktivität aufweisen, als die Gruppen ohne eine BMP-7 Gabe.

Dabei zeigt die Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7) nach dem 1. Monat eine um ca. das Zehnfache erhöhte AP-Aktivität, gegenüber den Gruppen ohne eine BMP-7 Applikation. Im Vergleich zur Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) gibt es im 1. Monat nur geringfügige Unterschiede in der AP-Aktivität (ca. 6%) .

Während des 2. Monats hat die AP-Aktivität, im Vergleich zum Vormonat, um ca. 20% abgenommen. Sie ist aber dennoch gegenüber den Gruppen ohne BMP-7 14-fach erhöht ($p < 0,05$). Auch gegenüber der Gruppe 3 hat die AP-Aktivität im 2. Monat um mehr als die Hälfte abgenommen.

Bei Versuchsende zeigt sich, im Vergleich zum Vormonat, dass die AP-Aktivität um ca. 31% und im Vergleich zum 1. Monat um ca. 46%, weiter abgenommen hat. Auch gegenüber der Gruppe 3 zeigt sich weiterhin ein Unterschied der AP-Aktivität um fast das Vierfache, im Vergleich zum Vormonat. Dennoch ist die AP-Aktivität gegenüber den Gruppen ohne eine BMP-7 Applikation immer noch um das 11-fache erhöht ($p < 0,01$ Gruppe 1 vs. 2, $p < 0,01$ Gruppe 1 vs. 4).

Die Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) zeigt im 1. Monat, ähnlich wie die Gruppe 1, höhere AP-Aktivitäten um fast das Zehnfache, gegenüber den Gruppen ohne eine BMP-7 Applikation. Wesentliche Unterschiede in Bezug auf die Gruppe 1 bestehen nicht.

Im 2. Monate kommt es, im Vergleich zum Vormonat, zu einer Zunahme der AP-Aktivität um fast das Doppelte. Dabei weist Gruppe 3 zum einen gegenüber den Gruppen ohne eine BMP-7 Applikation eine, um ca. das 34-fache, erhöhte AP-Aktivität auf und zum anderen ist sie, gegenüber der Gruppe 1, um mehr als das Doppelte erhöht.

Bei Versuchsende kommt es noch einmal zu einem Anstieg der AP-Aktivität im Vergleich zum Vormonat um ca. 10%. Ausgehend vom 1. Monat ergibt das eine Erhöhung um fast das Doppelte. Die AP-Aktivität der Gruppe 1 ist währenddessen um fast das 4-fache geringer. Die AP-Aktivität gegenüber den Gruppen ohne eine BMP-7 Applikation ist fast 42-fach erhöht.

Die Gruppen 2 und 4 (ohne BMP-7 Applikation) weisen während des gesamten Verlaufs eine, im Vergleich zu den Gruppen mit einer BMP-7 Applikation, konstant niedrige AP-Aktivität auf, die im Schnitt 10 bis 42-fach geringer ist. Wesentliche Unterschiede zwischen Gruppe 2 und 4 bestehen nicht.

Die Gruppe 2 (Sehne+OB) weist im Verlauf vom 1. auf den 2. Monat eine Abnahme der AP-Aktivität um mehr als die Hälfte auf und steigt zum Versuchsende um 50% wieder an. Diese Aktivität ist aber dennoch 40% niedriger als der Ausgangswert.

Gruppe 4 (Sehne) weist eine AP-Aktivitätsabnahme, ausgehend vom 1. Monat, um fast 32 % auf und nimmt im weiteren Verlauf um weitere 58% ab. Ausgehend vom 1. Monat ist das eine Abnahme um fast das Vierfache.

4.3. Ergebnisse des Zusatzversuches aus den Mediumüberständen

4.3.1. Ergebnisse aus der Bestimmung der AP

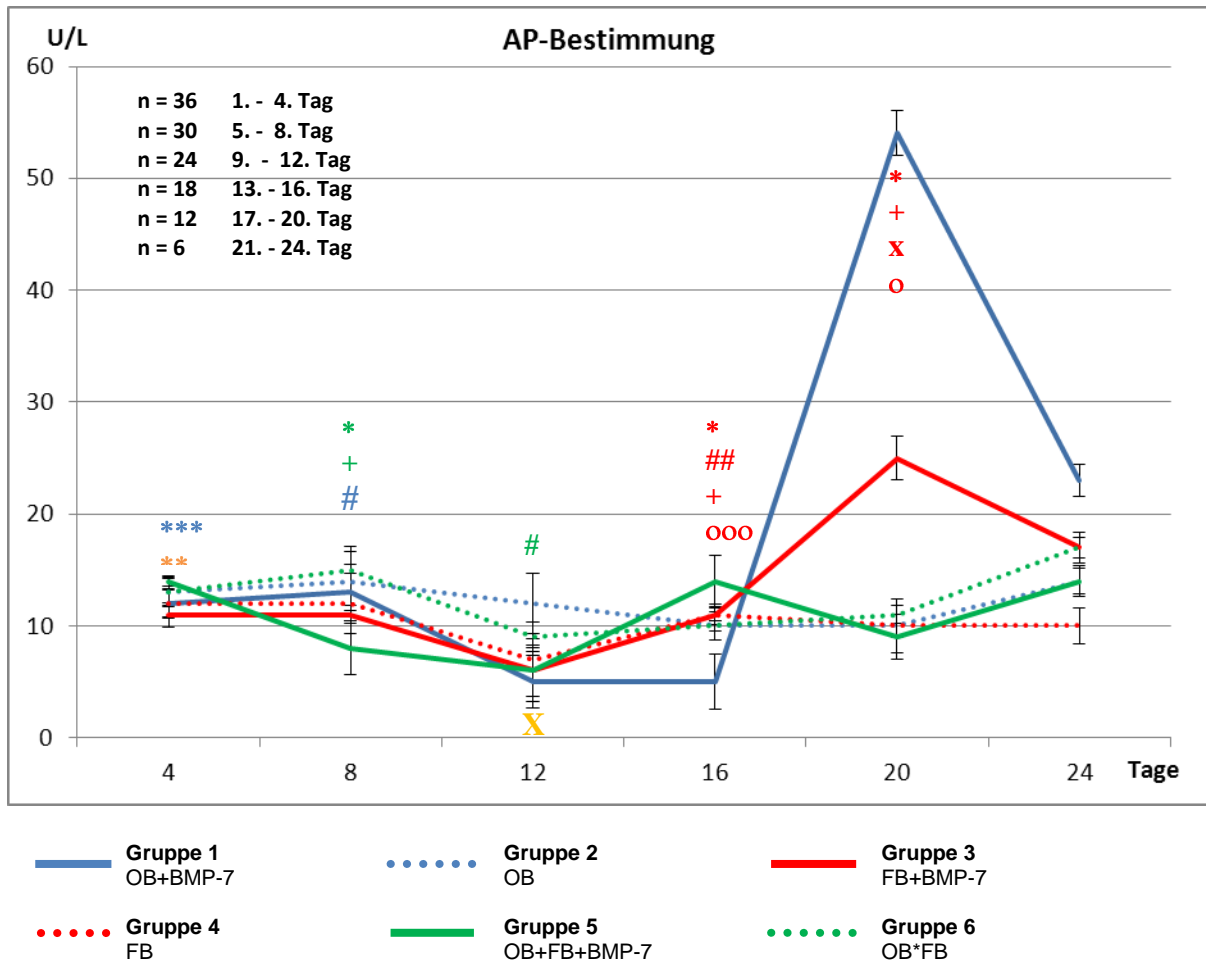


Abb. 34: **AP-Bestimmung** der **Gruppen 1 bis 6** über **24 Tage**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2: (*) p < 0,05	Gruppe 2 vs. 3: (*) p < 0,05	Gruppe 3 vs. 5: (***) p < 0,001
Gruppe 1 vs. 3: (##) p < 0,01	Gruppe 2 vs. 4: (#) p < 0,05	Gruppe 3 vs. 6: (#) p < 0,05
Gruppe 1 vs. 4: (+) p < 0,05	Gruppe 2 vs. 5: (+) p < 0,05	
Gruppe 1 vs. 5: (x) p < 0,05		Gruppe 4 vs. 5: (***) p < 0,01
Gruppe 1 vs. 6: (o) p < 0,05		
(ooo) p < 0,001		

In der Abb. 34 ist die AP-Aktivität aller Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. Zu erkennen ist, dass bis zum 18. Tag die Aktivität der AP bei allen Gruppen sich im Mittel um etwa 10 U/L befindet und es erst ab der 1. BMP-7 Applikation am 12. Tag messbare Unterschiede sichtbar sind.

In der Gruppe 1 (OB+BMP-7) sind diese Unterschiede erst ab dem 16. Tag zu messen. Nach dem 4. Tag steigt die AP-Aktivität nur minimal an und fällt Ende des 12. Tages um mehr als die Hälfte ab, bleibt dann für weitere 4 Tage konstant bei 5 U/L und erhöht sich signifikant um

den 20. Tag um fast das Zehnfache. Ausgehend vom Ausgangswert entspricht dies einer Zunahme um fast das 4,5-Fache. Zum Versuchsende hat sich die AP-Aktivität wieder um mehr als die Hälfte reduziert, sie ist aber dennoch fast doppelt so hoch wie die Ausgangsaktivität (S. auch Abb.35)

Die AP-Aktivität der Gruppe 3 (FB+BMP-7) weist um den 4. und 8. Tag einen konstanten Verlauf auf und fällt bis zum 12.Tag um fast die Hälfte ab. Nach der ersten BMP-7 Applikation nimmt die AP-Aktivität bis zum 16. Tag wiederum um fast das Doppelte zu. Im weiteren Verlauf nimmt diese um das Zweifache zu und erreicht Ende des 20. Tages die höchst gemessene Aktivität. Ausgehend vom Ausgangswert ist diese doppelt so hoch. Zum Versuchsende sinkt die AP-Aktivität um ca. 30%, ist aber trotzdem noch ca. 54% höher als die Ausgangs-Aktivität (S. auch Abb.35).

In der Gruppe 5 (OB+FB+BMP-7) kommt es, ausgehend vom 4. Tag auf den 8. Tag, zu einer Abnahme der AP-Aktivität um fast die Hälfte. Bis zum 12. Tag nimmt sie um weitere 25% ab. Erst nach der ersten BMP-7 Gabe nimmt die AP-Aktivität um mehr als die Hälfte wieder zu. Weitere Aktivitätszunahmen werden jedoch nicht mehr gemessen.

Die Gruppen ohne eine BMP-7 Applikation zeigen im Wesentlichen keine besonderen Unterschiede im gesamten Versuchszeitraum. Sie weisen eine konstante AP-Aktivität um ca. 12 U/l auf und zeigen keine extremen Zu- oder Abnahmen.

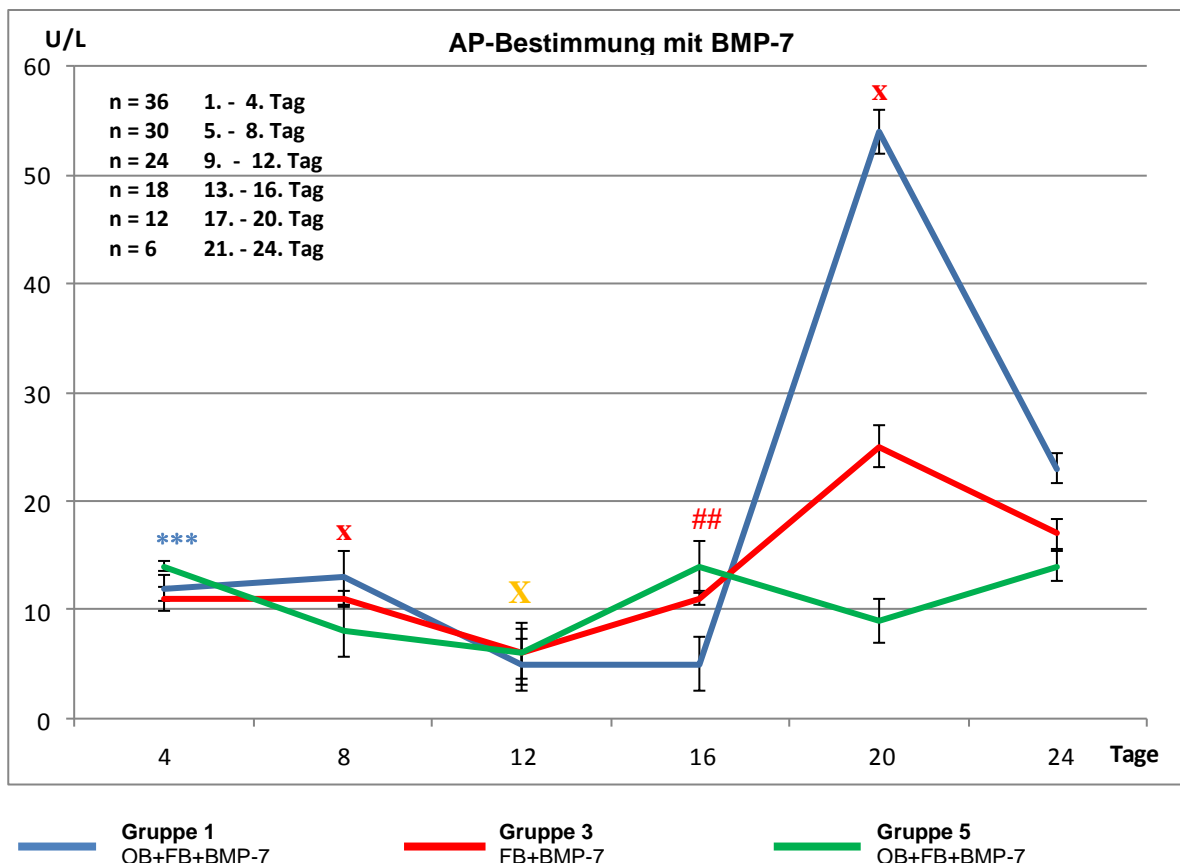


Abb. 35: **AP-Bestimmung** der **Gruppen 1, 3 und 5** über **24 Tage**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X), signifikante Konzentrationsunterschiede siehe Abbildung 34.

In Abb. 35 ist ein deutlicher Anstieg der AP-Aktivität der Gruppe 1 (OB+BMP-7) ab dem 16.Tag um fast das Zehnfache zu erkennen. Zudem nimmt nach der ersten BMP-7 Applikation die AP-Aktivität der Gruppe 3 (FB+BMP-7) bis zum 20. Tag konstant zu und steigt, ausgehend vom Ausgangswert, um mehr als das Doppelte. In der Gruppe 5 sind keine wesentlichen Unterschiede gemessen worden. Enorme Zunahmen oder Abnahmen der AP-Aktivität werden während der gesamten Versuchslaufzeit nicht beobachtet.

4.3.2. Ergebnisse aus der Bestimmung von Lactat

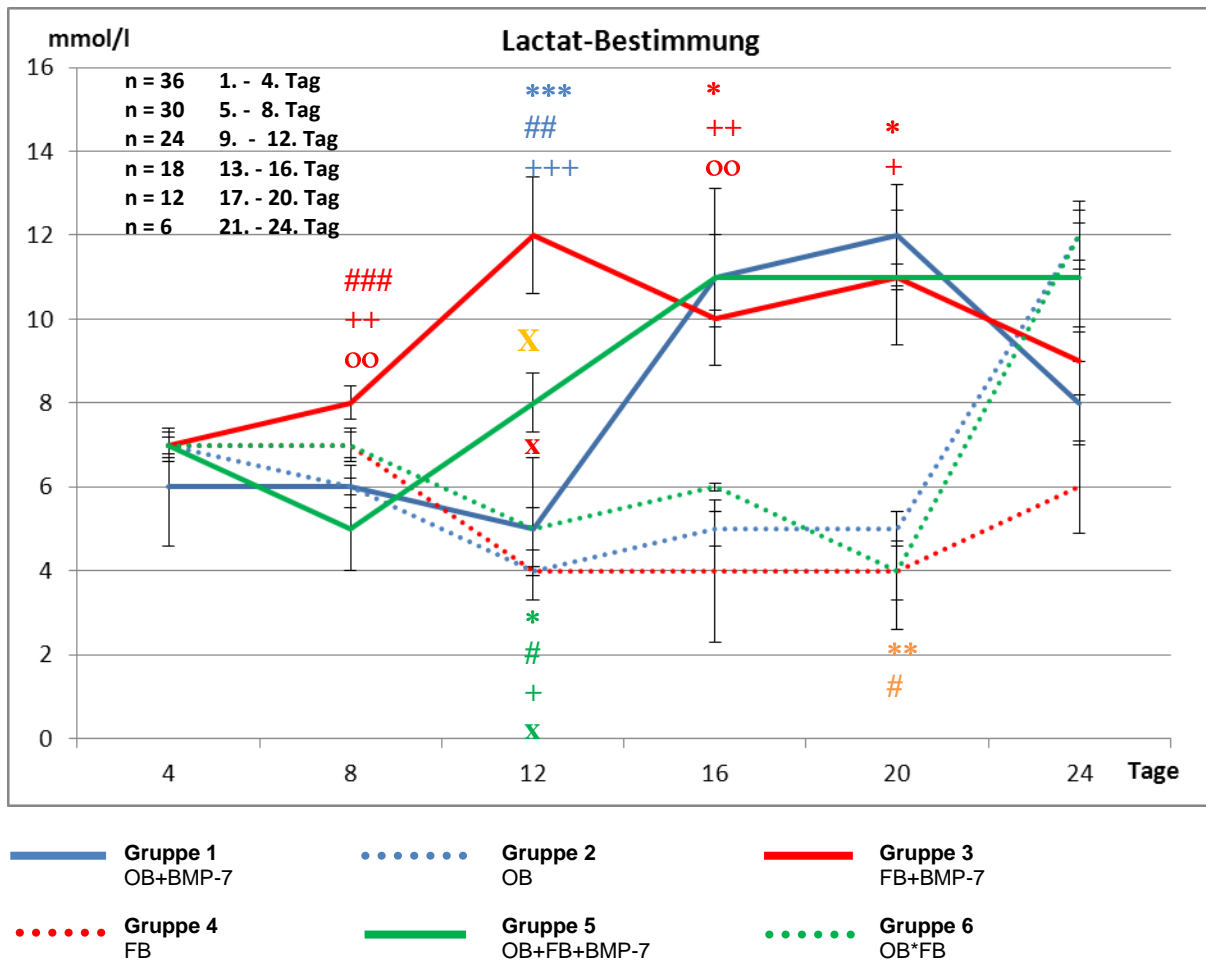


Abb. 36: **Lactat-Bestimmung** der Gruppen 1 bis 6 über 24 Tage. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2: (*) p < 0,05	Gruppe 2 vs. 3: (*) p < 0,05	Gruppe 3 vs. 4: (***) p < 0,001
Gruppe 1 vs. 3: (###) p < 0,001	Gruppe 2 vs. 4: (#) p < 0,05	Gruppe 3 vs. 5: (##) p < 0,01
Gruppe 1 vs. 4: (+) p < 0,05	Gruppe 2 vs. 5: (+) p < 0,05	Gruppe 3 vs. 6: (+++) p < 0,001
(++) p < 0,01	Gruppe 2 vs. 6: (x) p < 0,05	
Gruppe 1 vs. 5: (x) p < 0,05		Gruppe 4 vs. 5: (**) p < 0,01
Gruppe 1 vs. 6: (oo) p < 0,01		Gruppe 4 vs. 6: (#) p < 0,05

Die Abb. 36 gibt den Lactatgehalt aller Versuchsgruppen über die gesamte Versuchslaufzeit wieder. Grob zusammengefasst kann man beobachten, dass die Gruppen mit einer BMP-7 Applikation (Gruppe 1,3 und 5) einen höheren Lactatgehalt aufweisen, als die Gruppen ohne eine BMP-7 Gabe (Gruppe 2,4 und 6). Letztere Gruppen haben einen konstant niedrigeren Gehalt um ca. 6 mmol/l und steigen erst ab dem 20. Tag an. Insbesondere in der Gruppe 2 (OB) und der Gruppe 6 (OB+FB) kommt es zu einem Anstieg um mehr als die Hälfte (2,4-fach Gruppe 2 und 3-facher Anstieg bei Gruppe 6).

Innerhalb der Gruppen die eine BMP-7 Applikation erhalten haben, kann man beobachten, dass die Lactat-Konzentration der Gruppe 1 (OB+BMP-7) ab der ersten BMP-7 Gabe um

etwas mehr als die Hälfte ansteigt , dann um den 20. Tag um ca. weitere 8% ansteigt und im Anschluß bei Versuchsende um ca.33% wieder abnimmt.

Der Lactatgehalt der Gruppe 3 (FB+BMP-7) zeigt eine kontinuierliche Zunahme, mit einer ersten Konzentrationsspitze um den 12. Tag, die, ausgehend vom 4. Tag, eine Zunahme um ca. 71% darstellt. Nach der ersten BMP-7 Gabe fällt die Konzentration um ca. 16% ab, sie steigt jedoch am 20. Tag um 10% wieder an. Bei Versuchsende verringert sich der Lactat-Gehalt um ca.18%.

In der Gruppe 5 (OB+FB+BMP-7) nimmt die Lactat-Konzentration um ca. 28% erst ab und steigt dann bis zum 16. Tag kontinuierlich an. Ausgehend vom 8.Tag ist das eine Zunahme um mehr als die Hälfte. Anschließend verbleibt die Konzentration konstant bei 11 mmol/l. Wie auch im Hauptversuch lagen alle Lactatwerte in dem, vorher mittels eines MTT-Tests, festgelegtem Normbereich, der einen Lactatgehalt von 18mmol/l nicht überschreiten sollte.

4.3.3. Ergebnisse aus der Bestimmung von LDH

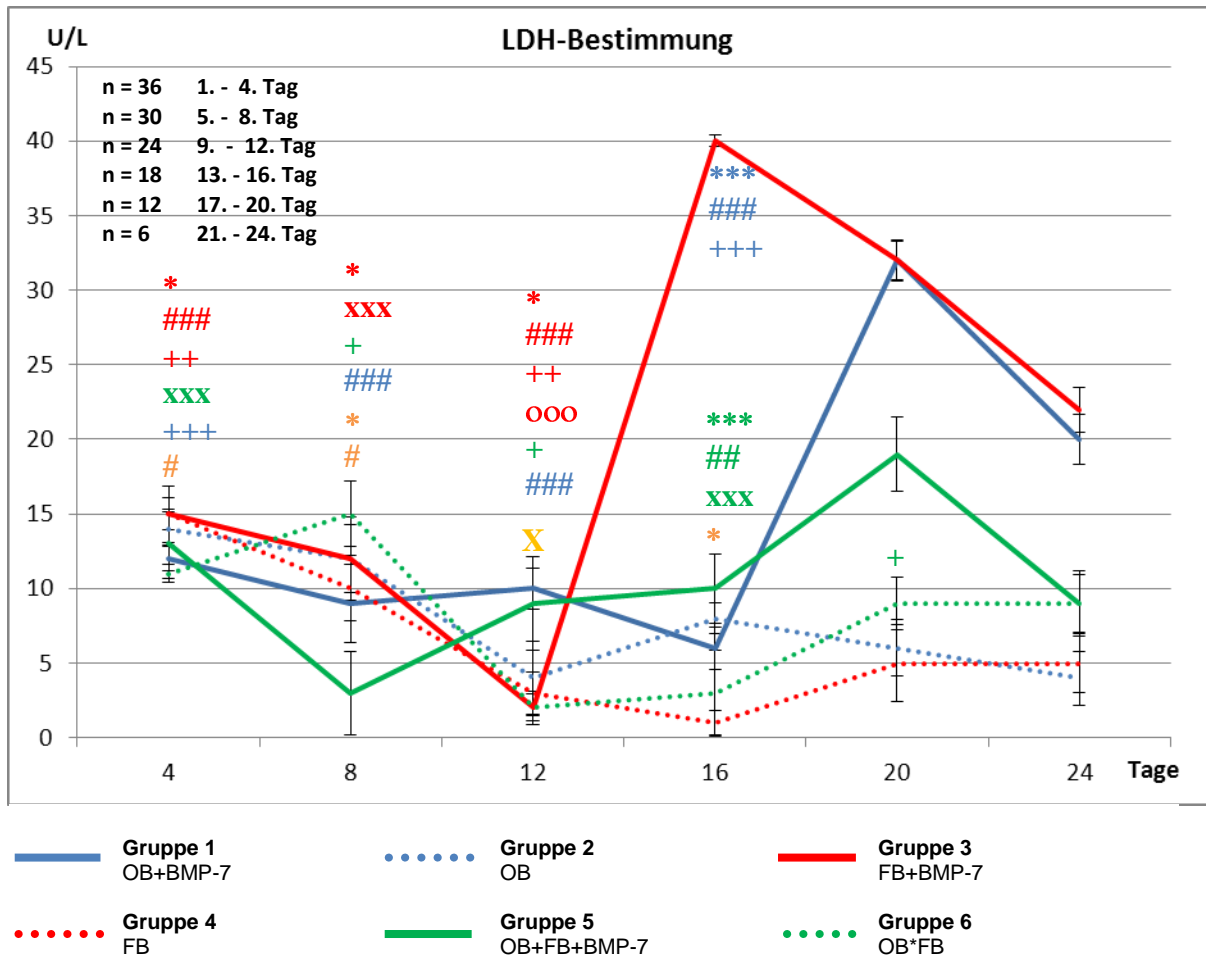


Abb. 37: **LDH-Bestimmung** der **Gruppen 1 bis 6** über **24 Tage**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2: (*) $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. 3: (***) $p < 0,001$ Gruppe 3 vs. 4: (***) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 3: (###) $p < 0,001$ Gruppe 2 vs. 4: (##) $p < 0,01$ Gruppe 3 vs. 5: (###) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 4: (++) $p < 0,01$ Gruppe 2 vs. 5: (+) $p < 0,05$ Gruppe 3 vs. 6: (+++) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 5: (xxx) $p < 0,001$ Gruppe 2 vs. 6: (xxx) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 6: (ooo) $p < 0,001$ Gruppe 4 vs. 5: (*) $p < 0,05$
 Gruppe 4 vs. 6: (#) $p < 0,05$

In dieser Abb. ist die LDH-Aktivität aller Versuchsgruppen abgebildet. Zu beobachten ist eine Zunahme der LDH-Aktivität in den Gruppen mit einer BMP-7 Applikation (Gruppe 1,3 und 5), nach der ersten BMP-7 Gabe, während die Gruppen ohne BMP-7 (Gruppe 2,4 und 6) keine wesentlichen Unterschiede aufweisen

In der Gruppe 1 kommt es, nach einem konstanten Verlauf innerhalb der ersten 12 Tage, zu einer Abnahme der LDH-Aktivität nach der ersten BMP-7 Applikation um ca. 40%. Um den 20. Tag nimmt die Aktivität jedoch um mehr als das Fünffache zu. Bei Versuchsende hat die LDH-Aktivität wiederum um ca. 38% abgenommen, ist aber dennoch fast doppelt so hoch wie der Ausgangswert.

Bei der Gruppe 3 kommt es ausgehend von Tag 4 bis zum 12. Tag zu einer kontinuierlich Abnahme der LDH-Aktivität, mit einem Abfall, ausgehend vom Ausgangswert um das 7,5-fache. Nach der ersten BMP-7 Gabe nimmt die LDH-Aktivität jedoch wieder stark zu und steigt um das 20-Fache an ($p < 0,001$). Bis zum Versuchsende nimmt die LDH Aktivität zwar wieder um fast die Hälfte ab, sie ist aber dennoch ca. 47% höher als die Ausgangsaktivität.

In der Gruppe 5 (OB+FB+BMP-7) kommt es, ähnlich wie in Gruppe 3, zunächst zu einer Abnahme der LDH-Aktivität um ca. 77%. Im Anschluss daran steigt jedoch die LDH-Aktivität kontinuierlich bis zum 20. Tag um das 6-Fache an. Ausgehend vom Ausgangswert entspricht das einer Zunahme von ca. 46%. Gegen Ende der Versuchslaufzeit nimmt die LDH-Aktivität um mehr als die Hälfte wieder ab.

Die Gruppen 2, 4 und 6 (ohne BMP-7 Applikation) weisen während des gesamten Versuchs keine wesentlichen Zu- oder Abnahmen der LDH- Aktivität auf. Vom 4. bis zum 8. Tag weisen die drei Gruppen einen konstanten Verlauf auf. Um den 12. Tag kommt es in allen Gruppen zu einer Abnahme der Aktivität um mehr als die Hälfte. Während der nächsten Tage nimmt die LDH-Aktivität in den Gruppen jedoch langsam wieder zu. Bei Versuchsende nimmt die LDH-Aktivität in der Gruppe 2 etwas ab und ist damit 3,5-fach niedriger, als zu Beginn. In den Gruppe 4 und 6 kommt es zu keinem weiteren Abfall, dennoch sind die zuletzt gemessenen Aktivitäten, bezogen auf den Ausgangswert, erniedrigt (Gruppe 4 um das Dreifache und Gruppe 6 um ca. 18%).

4.4. Ergebnisse der AP-Bestimmung des Zusatzversuches aus der Zelllyse

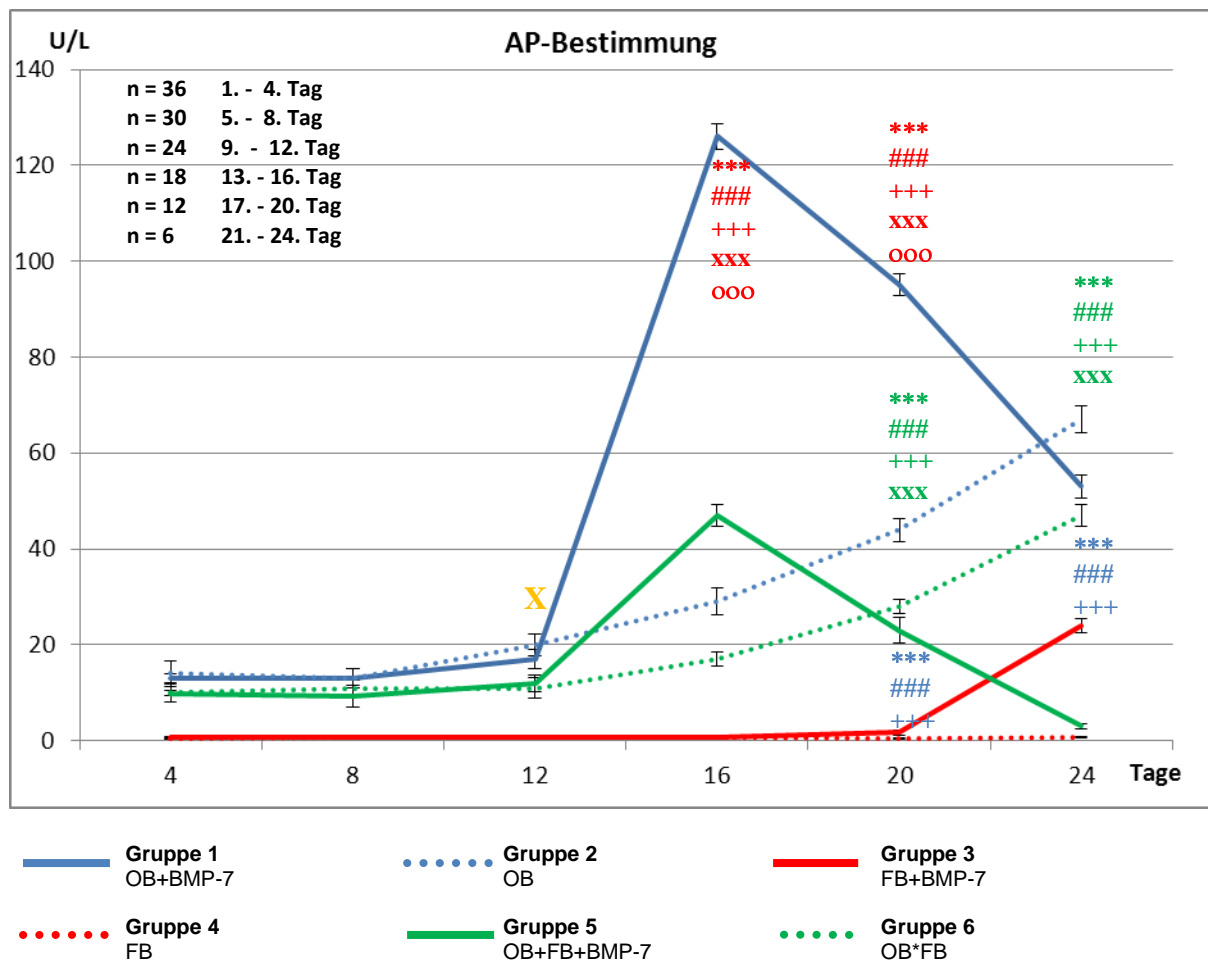


Abb. 38: **AP-Bestimmung** der **Gruppen 1 bis 6** über **24 Tage**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 2: (***) $p < 0,001$ Gruppe 2 vs. 3: (***) $p < 0,001$ Gruppe 3 vs. 4: (***) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 3: (###) $p < 0,001$ Gruppe 2 vs. 4: (###) $p < 0,001$ Gruppe 3 vs. 5: (###) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 4: (+++) $p < 0,001$ Gruppe 2 vs. 5: (+++) $p < 0,001$ Gruppe 3 vs. 6: (+++) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 5: (xxx) $p < 0,001$ Gruppe 2 vs. 6: (xxx) $p < 0,001$
 Gruppe 1 vs. 6: (ooo) $p < 0,001$

In der Abb. 38 ist die AP-Aktivität aller Versuchsgruppen im gesamten Verlauf aufgezeigt. Innerhalb der Gruppen mit Osteoblasten (Gruppe 1, 2, 5 und 6) ist in den ersten 12 Tagen ein relativ konstanter Verlauf der AP-Aktivität zu erkennen, während in den Gruppen mit ausschließlich Fibroblasten (Gruppe 3 und 4) fast keine AP-Aktivität nachgewiesen wird.

In den Gruppen mit einer BMP-7 Applikation (Gruppe 1, 3 und 5) nimmt, mit Ausnahme der Gruppe 3 (FB+BMP-7), die AP-Aktivität nach der ersten BMP-7 Gabe sehr stark zu. So steigt die AP-Aktivität der Gruppe 1 (OB+BMP-7) um ca. das Siebenfache ($p < 0,001$) und die der Gruppe 5 (OB+FB+BMP-7) um fast das Vierfache. Allerdings ist die AP-Aktivität der

Gruppe 5 im Vergleich zur Gruppe 1 um ca. das Dreifache niedriger. Gruppe 3 zeigt weiterhin keine wesentlichen Zunahmen.

Ab dem 16. Tag nimmt die AP-Aktivität der Gruppe 1 und 5 kontinuierlich ab. Bis zum Versuchsende hat sich die Aktivität der Gruppe 1 um mehr als die Hälfte reduziert, sie ist aber dennoch, im Vergleich zum Ausgangswert um das Vierfache erhöht. Währenddessen sinkt die AP-Aktivität der Gruppe 5 unter den Ausgangswert zurück und hat so um ca. das 15-Fache abgenommen. Die Gruppe 3 dagegen nimmt vom 20. auf den 24. Tag um ca. das 14-Fache zu ($p < 0,001$).

In den Gruppen 2 (OB) und 6 (OB+FB) ist ein exponentieller signifikanter Anstieg der AP-Aktivität zu erkennen. Dabei weist aber die Gruppe 2 im gesamten Verlauf stets höhere Werte im Vergleich zur Gruppe 6 auf, im Schnitt ca. 51% höher. Zum Versuchsende haben sich die AP-Aktivität der Gruppe 2 und 6, ausgehend vom Ausgangswert, jeweils ca. um das Fünffache erhöht (S. auch Abb. 39 b). In der Gruppe 4 (FB) kommt es während der gesamten Versuchslaufzeit zu keiner Zunahme der AP-Aktivität. Sie liegt im Schnitt bei 0,6 U/l.

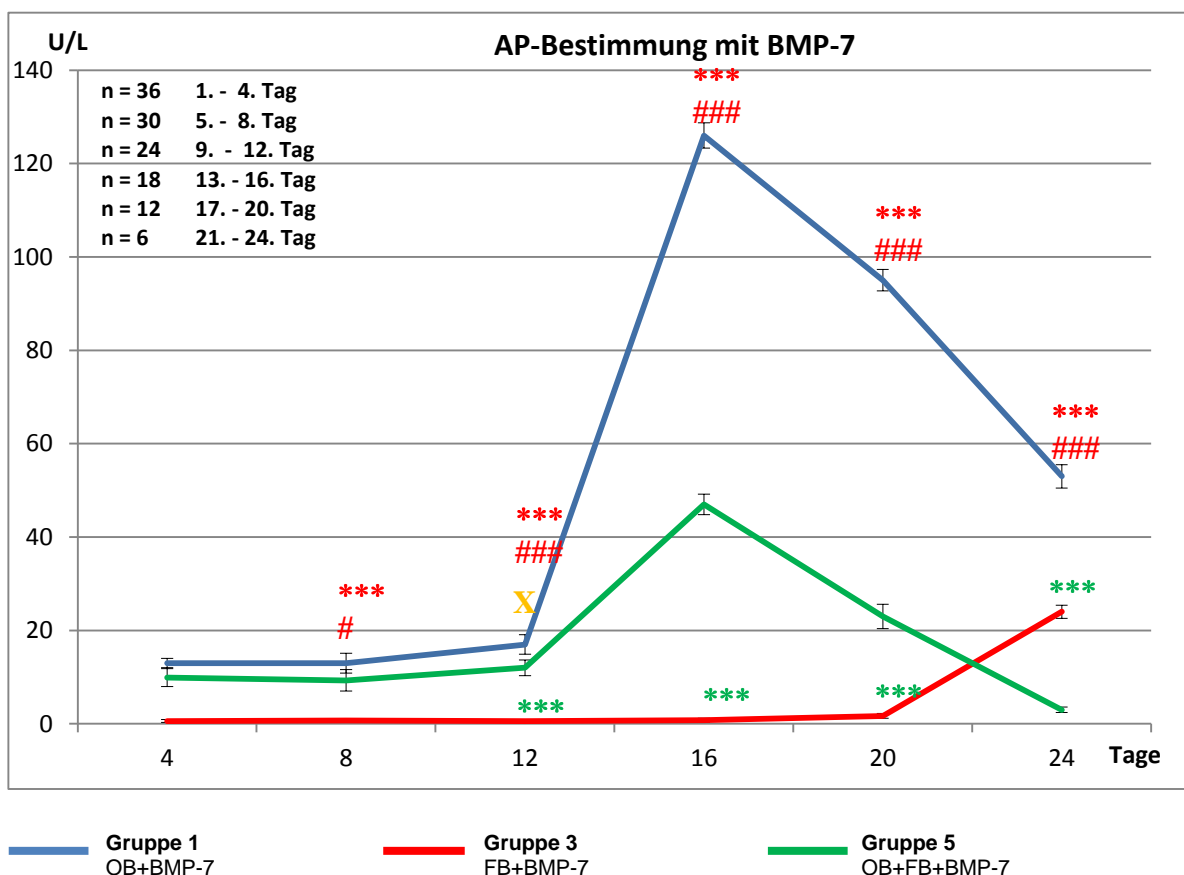


Abb.39a:: **AP-Bestimmung** der Gruppen **mit BMP-7 Applikation** über **24 Tage**. Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 1 vs. 3: (***) $p < 0,001$

Gruppe 3 vs. 5: (***) $p < 0,001$

Gruppe 1 vs. 5: (#) $p < 0,05$

(###) $p < 0,001$

Die Abb. 39a zeigt eine starke Zunahme der AP-Aktivität nach der ersten BMP-7 Gabe. Dabei steigt die AP-Aktivität der Gruppe 1 um das Siebenfache, die der Gruppe 5 um das Vierfache. In der Gruppe 3 kommt es erst ab dem 20. Tag zu einer Zunahme der AP-Aktivität. Sie steigt um das 14-Fache.

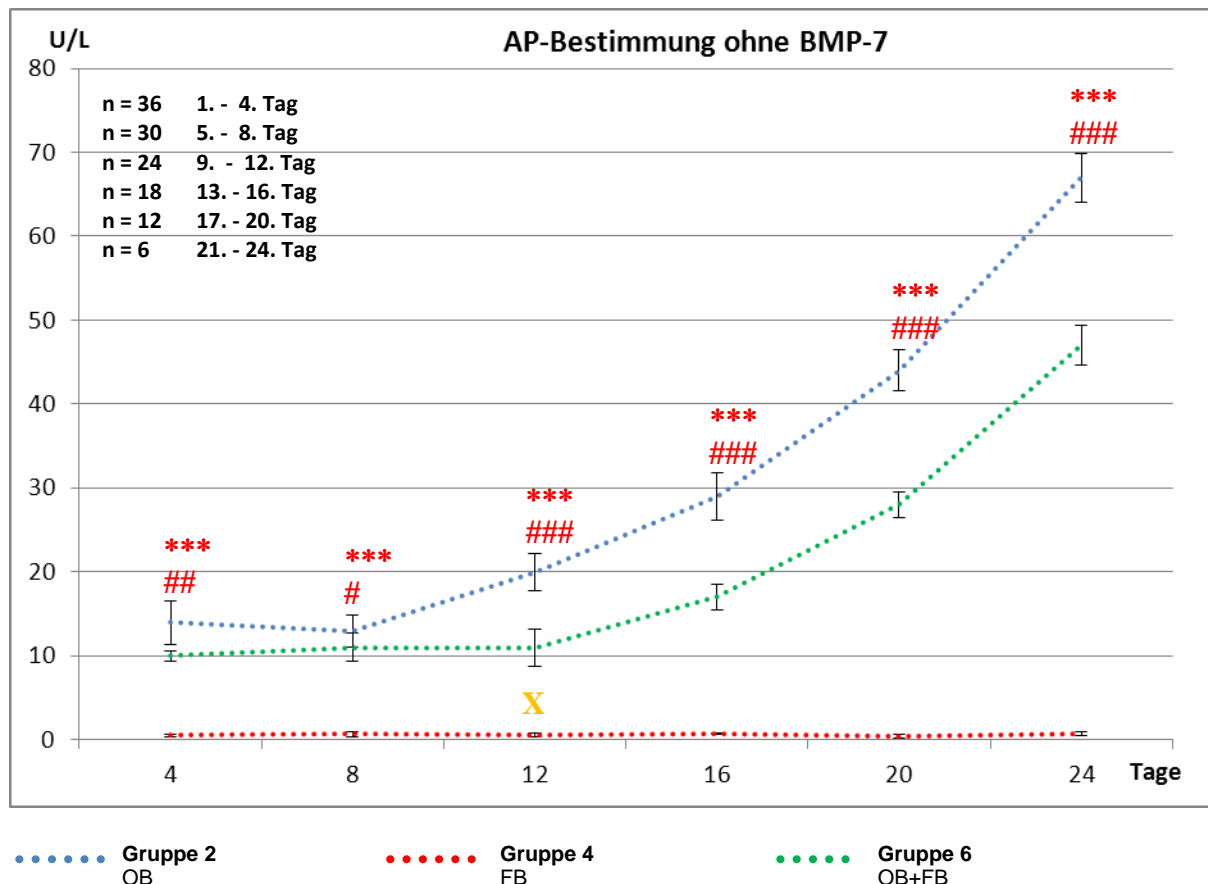


Abb.39b:: **AP-Bestimmung** der Gruppen **ohne BMP-7 Applikation** über **24. Tage**, Abgebildet sind Mittelwerte und +/- Standardabweichungen. BMP-7 Zugabe erstmalig nach der 1. Woche (X).

Signifikante Konzentrationsunterschiede:

Gruppe 2 vs. 4: (***) $p < 0,001$

Gruppe 2 vs. 6: (#) $p < 0,05$

(##) $p < 0,01$

(###) $p < 0,001$

In Abb, 39 b ist eine im Verlauf stets zunehmende AP-Aktivität der Gruppe 2 und 6 zu erkennen. Dabei ist die Aktivität der Gruppe 2 stets um ca. 51% höher, als die der Gruppe 6. Bis zum Versuchsende ist die AP-Aktivität der Gruppe 2 und 6, ausgehend vom Ausgangswert, jeweils um ca. das Fünffache gestiegen. Die Gruppe 4 zeigt keine wesentlichen Veränderungen und bleibt konstant niedrig.

4.5. Ergebnisse aus der Histologie

4.5.1. Ergebnisse der Färbungen im Gruppenüberblick

Die Abb. 40 zeigt einen Überblick der Sehnenpräparate aller vier Gruppen nach einer Kultivierungszeit in vitro von 4 Wochen. Zu erkennen sind Unterschiede in der Stärke der EZM-Bildung.

So weist die Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7) nach einem Monat eine starke EZM auf. In der Gruppe 2 (Sehne +OB) ist diese dagegen sehr gering ausgeprägt. Die Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) weist eine fast kontinuierlich durchgehende EZM auf. Zudem befinden sich in der EZM kalkähnliche Einschlüsse. Gruppe 4 (Sehne) weist, ähnlich wie Gruppe 2, nur eine geringe EZM Bildung auf.

Zusammengefasst ergibt sich daraus, dass in den Gruppen 1 und 3 (mit BMP-7 Applikation) die EZM nach einem Monat stärker ausgeprägt ist, während die EZM der Gruppen 2 und 4 beide nur gering ausgeprägt sind.

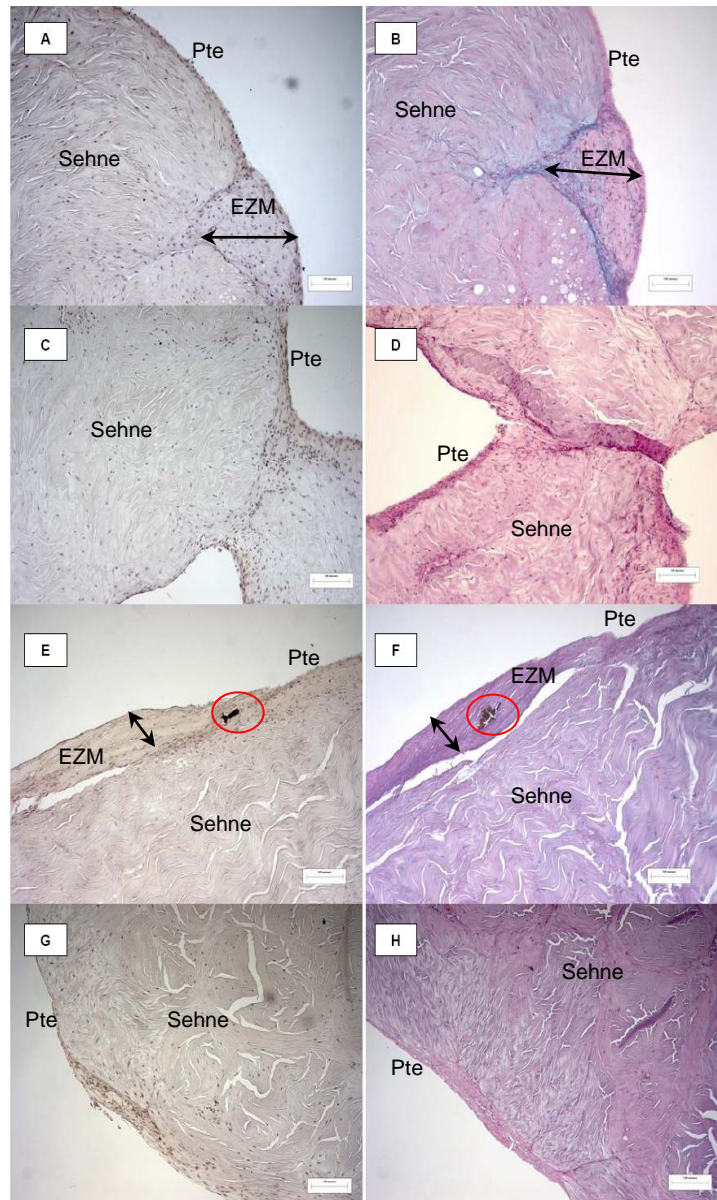


Abb. 40: Abbildung der Sehnen nach histologischer Färbung nach v. Kossa (links) und PAS (rechts) nach **1. Monat** (10er Objektiv). **A u. B:** Gruppe 1 (OB+Sehne+BMP-7), **C u. D:** Gruppe 2 (OB+Sehne), **E u. F:** Gruppe 3 (Sehne+BMP-7), **G u. H:** Gruppe 4 (Sehne).

Die Höhe der extrazellulären Matrix ist mittels der Pfeile dargestellt (↔). Die in der Gruppe 3 vorhandenen Kalkein-schlüsse sind mittels eines roten Kreises hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Peritendineum ext. (Pte).

Zu erkennen ist, dass insbesondere in den Gruppen mit einer BMP-7 Applikation (Gruppe 1 und 3) eine verstärkte EZM gebildet wurde.

In Abb. 41 sind die Sehnenpräparate der vier Versuchsgruppen nach einer Versuchszeit von 2 Monaten dargestellt. Zu beobachten ist bei der Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7) ein starkes Anwachsen der EZM. In der Gruppe 2 (Sehne+OB) ist nur eine schwache EZM zu beobachten, aber es sind starke Zellkernansammlungen am oberen Rand der Sehne festzustellen. Die Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) zeigt eine kontinuierlich durchgehende EZM, mit ebenfalls wieder kalkähnlichen Einlagerungen innerhalb der EZM. Gruppe 4 (Sehne) weist zwar eine kontinuierlich durchgehende, aber nur gering ausgeprägte, EZM auf. Zusammengefasst ergibt sich daraus, dass in den Gruppen 1 und 3 (mit BMP-7 Applikation) die EZM nach 2 Monaten stärker ausgeprägt ist. Währenddessen sind die Ausprägungen der EZM der Gruppen 2 und 4 gering.

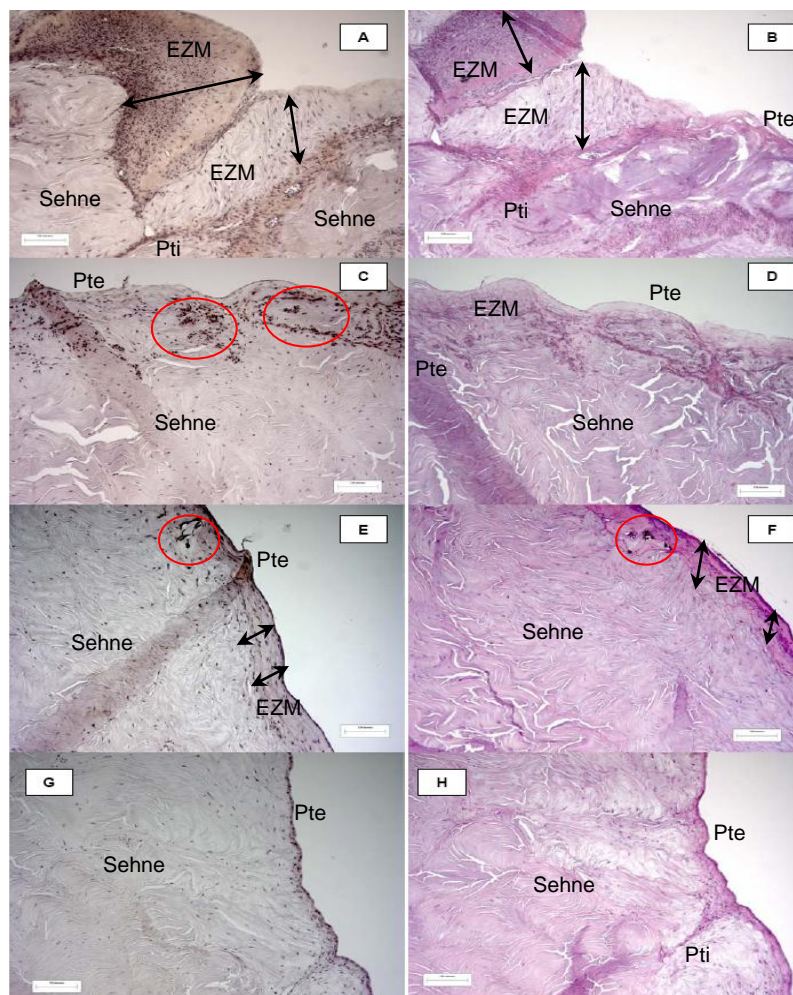


Abb. 41: Abbildung der Sehnen nach histologischer Färbung nach v. Kossa (links) und PAS (rechts) nach **2. Monat** (10er Objektiv). **A u. B:** Gruppe 1 (OB+Sehne+BMP-7), **C u. D:** Gruppe 2 (OB+Sehne), **E u. F:** Gruppe 3 (Sehne+BMP-7), **G u. H:** Gruppe 4 (Sehne).

Die Höhe der extrazellulären Matrix ist mittels der Pfeile dargestellt (↔). Die in der Gruppe 2 und 3 vorhandenen Kalkeinschlüsse sind mittels eines roten Kreises hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Peritendineum internum (Pti), Peritendineum externum (Pte).

Zu erkennen ist, dass insbesondere in den Gruppen mit einer BMP-7 Applikation (Gruppe 1 und 3) eine verstärkte EZM gebildet wurde.

Abbildung 42 zeigt die vier Versuchsgruppen nach einer Kultivierungszeit von 3 Monaten. In der Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7) sind starke EZM-Bildungen zu erkennen (\leftrightarrow), mit großen Osteoid Ablagerungen sowie kalkähnlichen Einschlüssen innerhalb des Osteoids. Die Gruppe 2 (Sehne+OB) zeigt eine stärker gewordene EZM-Bildung mit einer starken Zellkernansammlung unterhalb der EZM. Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) weist eine durchgehende kontinuierliche EZM auf, die fast überall von Osteoid durchwachsen ist. In der Gruppe 4 (Sehne) sind nur geringe EZM-Ablagerungen zu verzeichnen. Es sind hier aber auch verstärkte Zellkernansammlungen unterhalb der EZM zu beobachten. Zusammengefasst ergibt sich daraus, dass Gruppe 1 und Gruppe 3 nach 3 Monaten eine stärkere EZM Ausprägung vorweisen. In den Gruppen 2 und 4 sind diese Ausprägungen dagegen geringer.

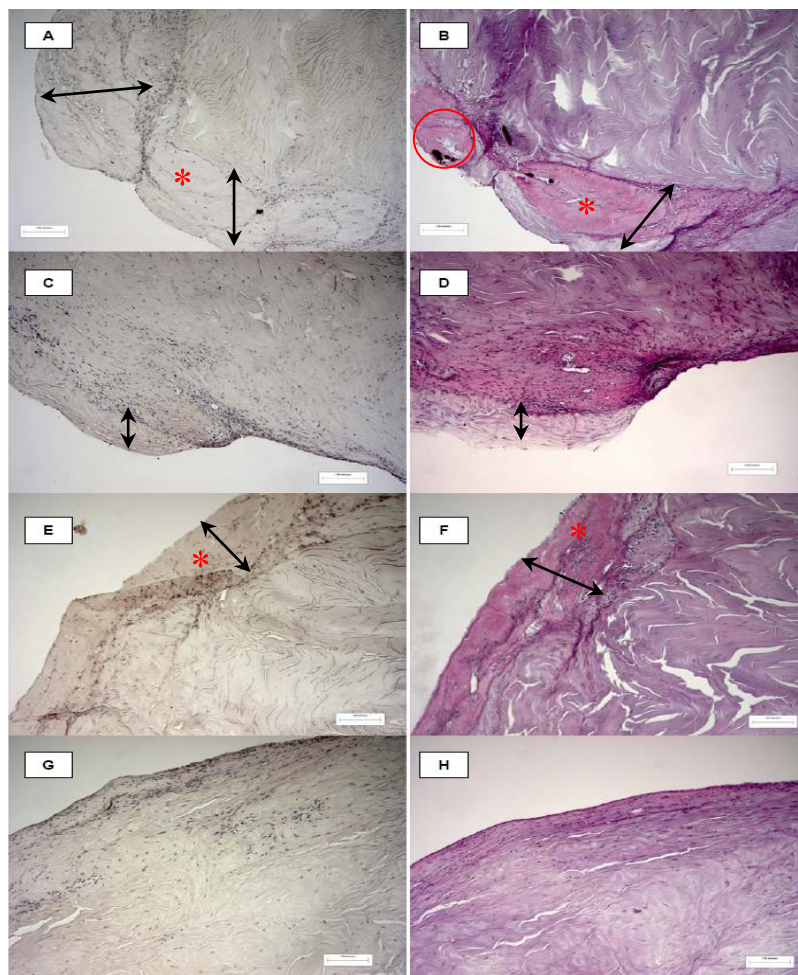


Abb. 42 : Abbildung der Sehnen nach histologischer Färbung nach v. Kossa (links) und PAS (rechts) nach **3. Monat** (10er Objektiv). **A u. B:** Gruppe 1 (OB+Sehne+BMP-7), **C u. D:** Gruppe 2 (OB+Sehne), **E u. F:** Gruppe 3 (Sehne+BMP-7), **G u. H:** Gruppe 4 (Sehne). Die Höhe der extrazellulären Matrix ist mittels der Pfeile dargestellt (\leftrightarrow). Die in der Gruppe 1 vorhandenen Kalkeinschlüsse sind durch einen roten Kreis, die Osteoid-Ablagerungen durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Peritendineum externum (Pte). Zu erkennen ist, dass es insbesondere in den Gruppen mit einer BMP-7 Applikation (Gruppe 1 und 3) zu einer verstärkten EZM-Bildung und Osteoid-Bildung kam.

4.5.2. Färbeergebnisse der Gruppe 1

In der Abb. 43 sind noch einmal alle Sehnenpräparate der Gruppe 1 (Sehne +OB+BMP-7) während des gesamten Versuchszeitraums im Überblick abgebildet. Hier ist zu erkennen, dass die EZM, im Verlauf vom 1. bis zum 3. Monat, immer mehr an Intensität zunimmt, was nicht nur an der Dicke und Länge der EZM auszumachen ist, sondern auch an der Ausprägung der Osteoid-Ansammlungen, die insbesondere im 3. Monat stark ausgeprägt sind.

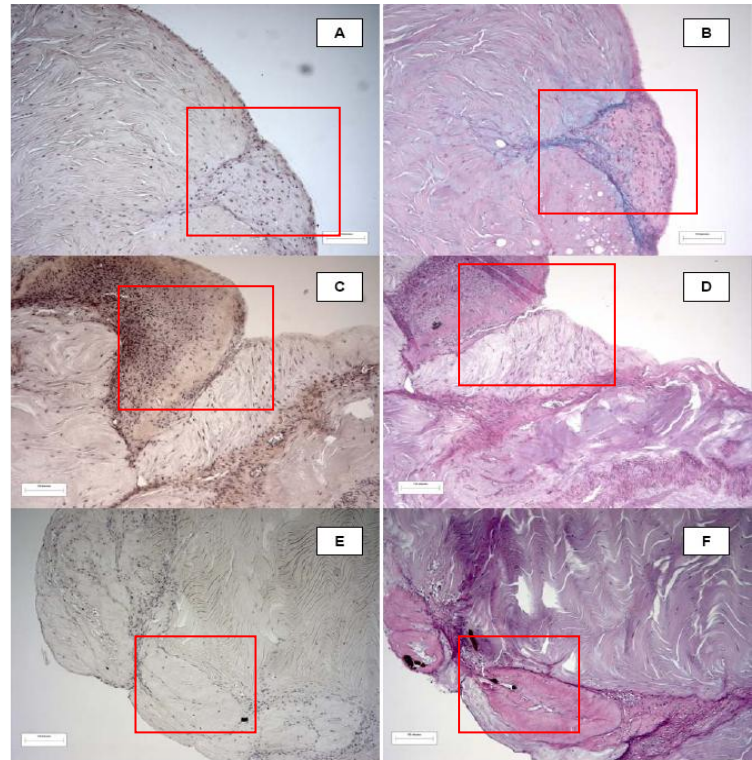


Abb. 43: Sehnen der **Gruppe 1** (Sehne+OB+BMP-7) nach histologischer Färbung nach v. Kossa und PAS. **A u. B:** 1. Monat, **C u. D:** 2. Monat, **E u. F:** 3. Monat. Die rot umrandeten Bereiche sind in den Abb. 44, 45 und 46 vergrößert dargestellt.

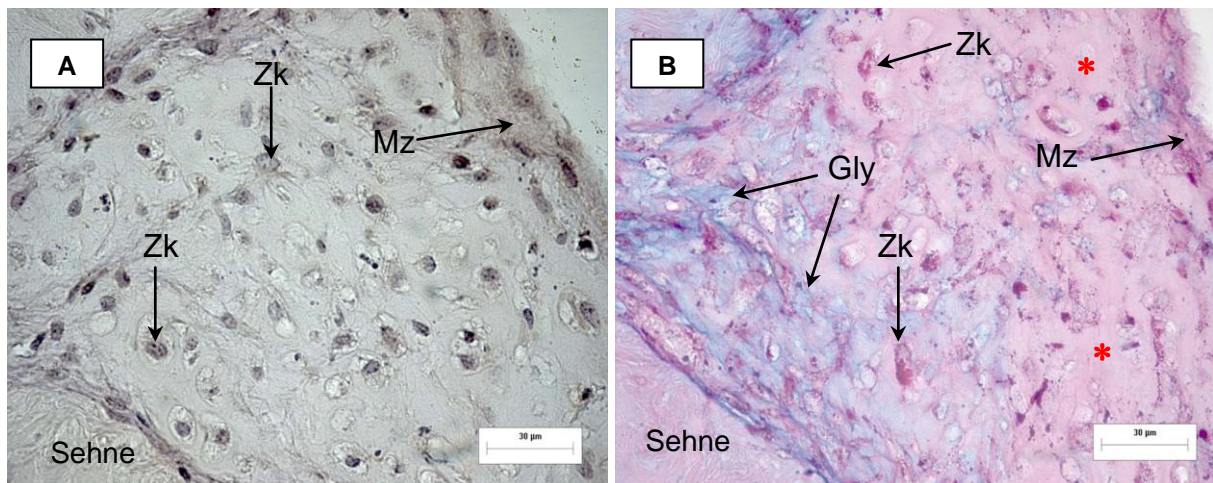


Abb. 44: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 1** (Sehne+OB+BMP-7) nach einer Versuchszeit von **4 Wochen**. **A:** v. Kossa-Färbung; **B:** PAS-Färbung (40er Objektiv). Die in der Gruppe 1 vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Glykosaminoglykane (Gly), Mineralisierungszone (Mz), Zellkerne (Zk).

In dem dargestellten Abschnitt der EZM sind vermehrte Zellkernansammlungen sowie Osteoidablagerungen zu erkennen. Zudem sind in Abb. B Glykosaminoglykan-Ablagerungen dargestellt. Die EZM ist von einer Mineralisierungszone umschlossen, die sich fein granuliert darstellt.

Abb. 44 zeigt einen Ausschnitt aus der EZM einer Sehne nach einem Monat. In Abb. A zu erkennen sind Zellkerne, die dunkel angefärbt und in die EZM eingelagert sind. Am äußeren rechten Rand befinden sich Zellkerne und Teile der EZM, die schwarz granuliert sind und damit beginnende Mineralisationsgrenzen darstellen können.

Abb. B zeigt ebenfalls einen Ausschnitt aus der EZM. Zu erkennen sind hier Einlagerungen von sauren Glykosaminoglykanen, die sich blaugrün anfärben. Zellkerne sind hier lila gefärbt. Zusätzlich ist zu beobachten, dass die EZM deutlich blassrosa gefärbt ist, was ein Hinweis für mineralisiertes Gewebe bzw. Osteoid Ansammlungen sein kann.

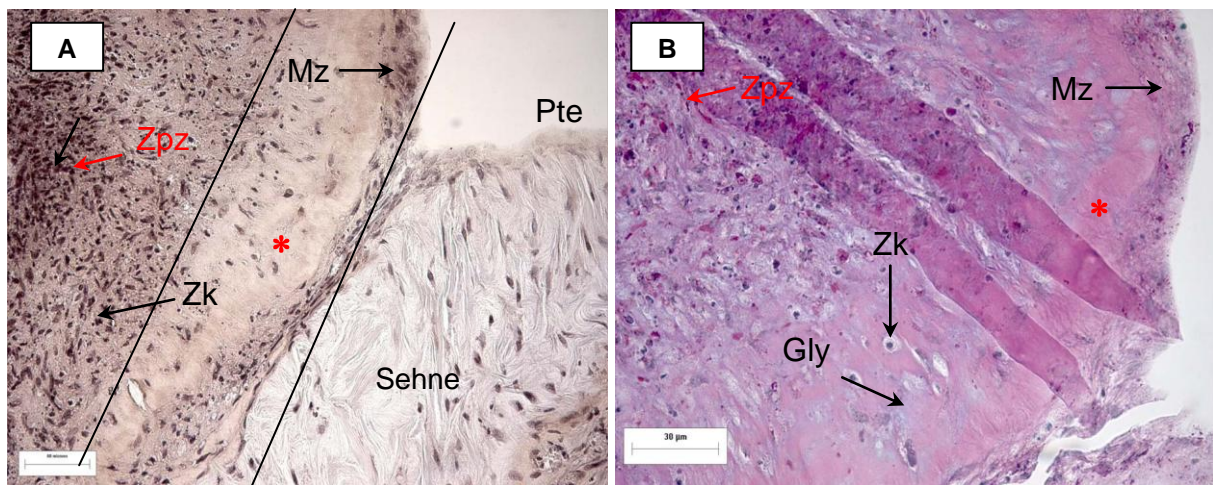


Abb. 45: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 1** (Sehne+OB+BMP-7) nach einer Versuchszeit von **8 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (20er Objektiv). Die in der Gruppe 1 vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Glykosaminoglykane (Gly), Mineralisierungszone (Mz), Peritendineum externum (Pte), Zellkerne (Zk), Zellproliferationszone (Zpz). In der dargestellten EZM sind in der Zellproliferationszone starke Zellkernansammlungen zu erkennen. Diese wird von einem Bereich vermehrter Osteoidablagerungen und einer Mineralisierungszone umschlossen. Zudem sind in Abb. B Glykosaminoglykan-Ablagerungen dargestellt.

Abb. 45 zeigt Sehnenpräparate nach einer Kultivierungszeit von 2 Monaten. Abb. A zeigt einen Ausschnitt der EZM. Zu erkennen sind drei Grenzschichten. Eine erste Zone (in Abb. links) mit starker Zellproliferation und Zellkernansammlungen, die allesamt dunkelrot, schwarz granuliert gefärbt sind; eine zweite (mittlere) Zone, die eine hellere, homogen gefärbte Struktur aufweist, mit vereinzelt Zellkernen; und eine dritte (rechts), fast weißlich gefärbte Zone. Die erste Zone markiert die Proliferationszone, die zweite Zone den Bereich der Osteoidablagerungen und die Mineralisierungszone. Die dritte Zone stellt den normalen Sehnenbereich dar.

In der Abb. B sind die Mineralisations- bzw. Osteoidgrenzen, die blassrosa angefärbt sind, noch besser zu erkennen. Zellkerne sind blau gefärbt.

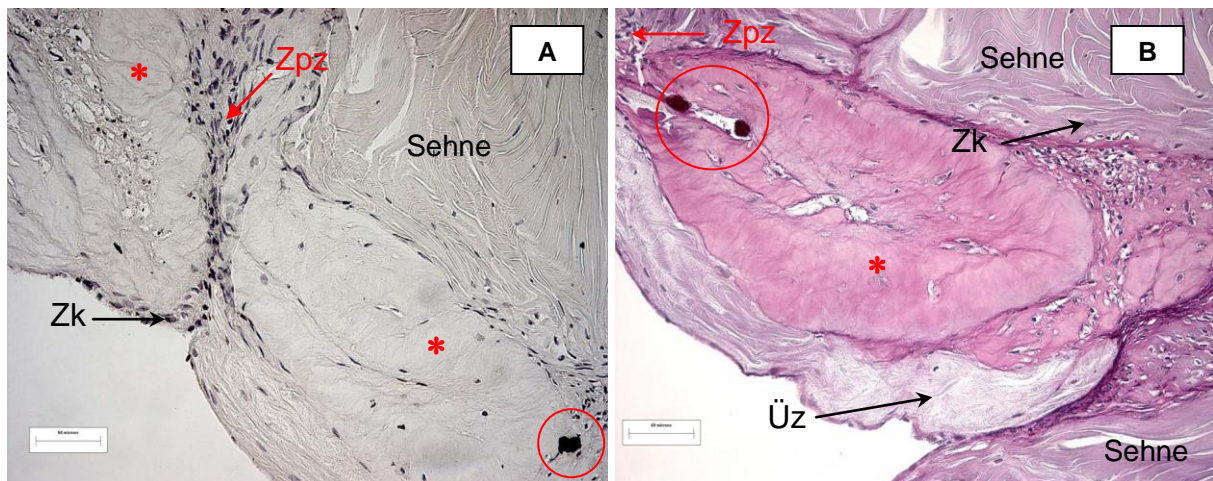


Abb. 46: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 1** (Sehne+OB+BMP-7) nach einer Versuchszeit von **11 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (20er Objektiv). Die in der Gruppe 1 vorhandenen Kalkeinschlüsse sind mittels eines roten Kreises, die Osteoid-Ablagerungen durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Übergangszone (Üz), Zellkerne (Zk), Zellproliferationszone (Zpz).

Zu erkennen sind große Osteoidablagerungen, die von Zellproliferationszonen mit verstärkten Zellkernansammlungen umgeben sind. Zusätzlich sind kalkähnliche Einschlüsse in beiden Abb. dargestellt.

In der Abb. 46 sind Sehnenpräparate nach einer Kultivierungszeit von 3 Monaten abgebildet.

Die Abb. A lässt wieder verschiedene Bereiche erkennen. Eine Proliferationszone, die umgeben ist von Osteoidansammlungen und Arealen des normalen Sehnenverlaufs. Die Zellkerne sind hier dunkelrot bis schwarz gefärbt. Im Osteoid sind noch vereinzelte Zellkerne zu erkennen. Die restliche Sehne zeigt einen normalen faserigen Verlauf.

In Abb. B sind die Osteoidansammlungen besser an der deutlichen blassrosa Färbung und Abgrenzung gegenüber den anderen Strukturen zu erkennen. Zusätzlich sind kalkähnliche Einschlüsse zu erkennen, die sich im Osteoid abgelagert haben.

Die große Osteoidablagerung umgibt im unteren Bildabschnitt eine Zone, die zum einen homogen gefärbt ist und zum anderen noch Sehnenfasern erkennen lässt. Dies könnte eine Übergangszone darstellen, aus der sich weitere Osteoidablagerungen entwickeln könnten. Zellkerne sind hier blau gefärbt.

4.5.3. Färbeergebnisse der Gruppe 2

Die Abb. 47 zeigt die Sehnen der Gruppe 2 (Sehnen+OB) über den gesamten Versuchszeitraum. Zu erkennen ist, dass im Verlauf vom 1. Monat zum 2. Monat keine wesentlichen Veränderungen auftreten. Einzig vermehrte Zellkernansammlungen lassen sich im 2. Monat erkennen. Im 3. Monat nimmt die Ausprägung der EZM sichtlich zu. Osteoidablagerungen sind teilweise vorhanden, kalkähnliche Ablagerungen wie in der Gruppe sind gar nicht zu beobachten.

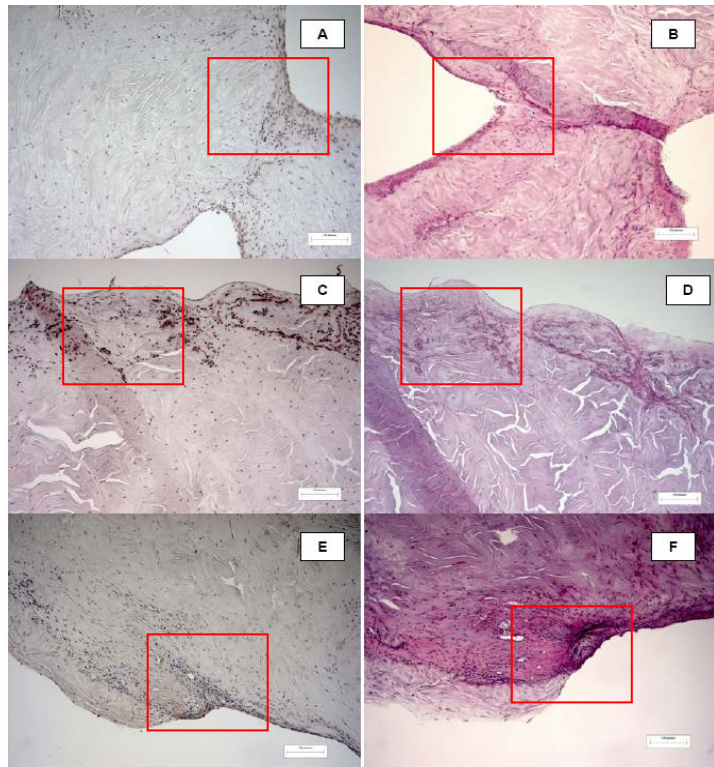


Abb. 47: Sehnen der **Gruppe 2** (Sehne+OB) nach histologischer Färbung nach v. Kossa und PAS. **A u. B:** 1. Monat, **C u. D:** 2. Monat, **E u. F:** 3. Monat. Die rot umrandeten Bereiche sind in den Abb. 48, 49 und 50 vergrößert dargestellt.

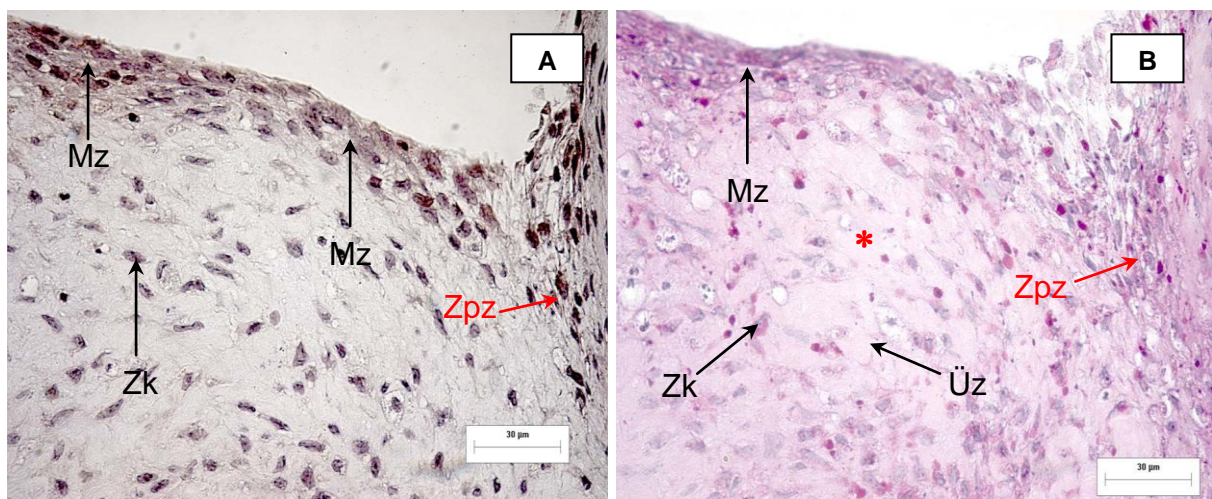


Abb. 48: Darstellung einer Sehne der **Gruppe 2** (Sehne+OB) nach einer Versuchszeit von **4 Wochen**. **A:** v. Kossa-Färbung; **B:** PAS-Färbung (40er Objektiv). Die in der Gruppe 2 möglichen vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Mineralisierungszone (Mz), Übergangszone (Üz), Zellkerne (Zk), Zellproliferationszone (Zpz).

Zu erkennen sind vermehrte Zellkernansammlungen im oberen Bildabschnitt, die fein granuliert einer Mineralisierungszone entsprechen können. Darunter sind diffus verteilte Zellkerne zu sehen, die in einer möglichen Übergangszone eingebettet sind. In Abb. B ist diese Übergangszone blassrosa gefärbt und kann daher ein Hinweis für mögliche Osteoidablagerungen sein.

In der Abb. 48 sind Sehnenpräparate nach einer Kultivierungszeit von einem Monat abgebildet. Abb. A lässt eine schmale Proliferationszone erkennen, mit dunkelrot gefärbten Zellkernen und z. T. schwarz granulierten Bereichen. Unter diesem Bereich liegen vermehrte Zellkernansammlungen, die auch allesamt dunkelrot angefärbt sind.

In Abb. B ist ebenfalls eine Proliferationszone im rechten Bildabschnitt dargestellt. Hier sind auch zwei verschiedene Bereiche zu erkennen: 1. ein dunkel lila angefärbter Bereich mit einer vermehrten Zellkernansammlung und dunkelblau bis lila angefärbten Zellkernen und 2. ein blassrosa angefärbter Bereich mit vielen Zellkernen, die allesamt dunkelblau bis lila gefärbt sind. Dieser Bereich könnte daher, aufgrund der blassrosa Färbung, für eine vermehrte Osteoidansammlung sprechen. Die starken Zellkernansammlung in diesen Ablagerungen und der noch z.T. vorhandene faserige Verlauf lassen dabei, wie in der Sehne der Gruppe 1 nach dem 3. Monat, an eine Übergangszone denken.

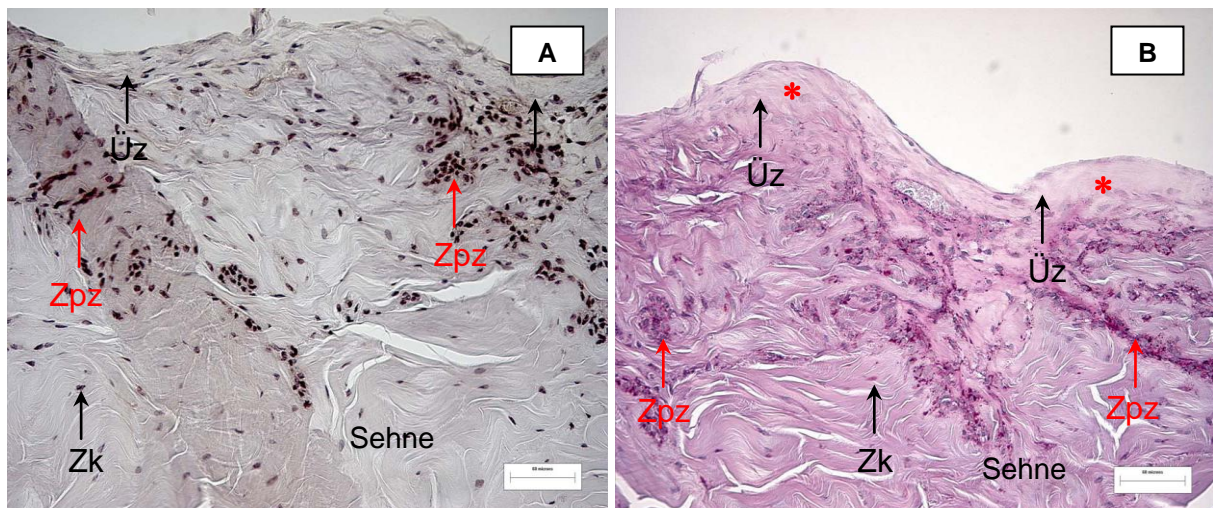


Abb. 49: Darstellung einer Sehne der **Gruppe 2** (Sehne+OB) nach einer Versuchszeit von **8 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (20er Objektiv). Die in der Gruppe 2 möglichen vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Übergangszone (Üz), Zellkerne (Zk), Zellproliferationszone (Zpz).

In dieser Abb. sind im oberen Abschnitt Bereiche mit vereinzelt Zellkernen und einem ansonsten homogen gefärbten, zellenlosen Anteil zu erkennen. Dieser kann einer sog. Übergangszone, mit beginnenden Osteoidablagerungen entsprechen. Darunter sind vermehrte Zellkernansammlungen dargestellt. Im unteren Bildausschnitt ist der normale Sehnenverlauf zu sehen.

Die Abb. 49 zeigt die Sehnen nach einer Versuchslaufzeit von 2 Monaten. In Abb. A sind drei Bereiche zu erkennen. Der erste, im oberen Bildausschnitt gelegene Bereich, ist sehr homogen, fast weiß gefärbt und enthält kaum noch Zellkerne. Dieser könnte einer sog. Übergangszone entsprechen. Der zweite (mittlere) Bereich ist stark durch Zellkernansammlungen charakterisiert und der dritte zeigt den normalen Faserverlauf der Sehne

Die Abb. B zeigt das gleiche Bild: eine blassrosa gefärbte homogene Zone mit vereinzelten Zellkernen, die mögliche Osteoidablagerungen darstellen könnte, eine lila gefärbte hohe Dichte an Zellkernen und den normalen Faserverlauf der Sehne.

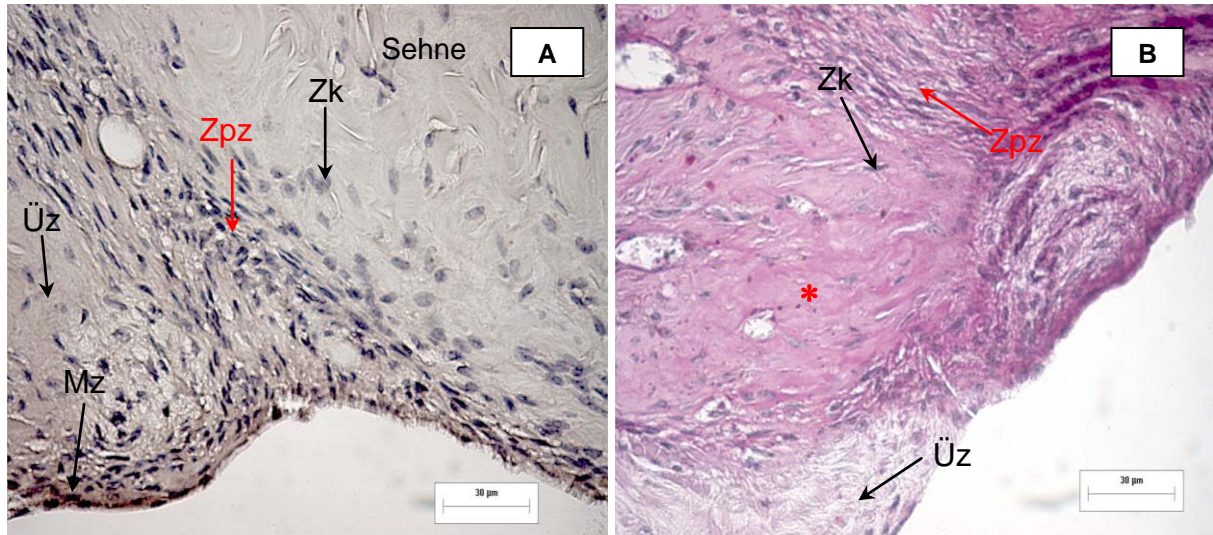


Abb. 50: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 2** (Sehne+OB) nach einer Versuchszeit von **11 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (40er Objektiv). Die in der Gruppe 2 möglichen vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Mineralisierungszone (Mz), Übergangszone (Üz), Zellkerne (Zk), Zellproliferationszone (Zpz).

In Abb. A sind vermehrte Zellkernansammlungen im unteren Bildausschnitt zu erkennen, die fein granuliert sind und einer Mineralisierungszone entsprechen können. Darüber befinden sich vermehrte Zellkernansammlung und darüber der normale Sehnenanteil. In Abb. B sind in der Mitte mögliche Osteoidablagerungen zu erkennen. Diese sind im oberen Bildausschnitt von vermehrten Zellkernansammlungen und im unteren von einer sog. Übergangszone umgeben.

In der Abb. 50 sind die Sehnenpräparate des 3. Monats abgebildet. Abb. A lässt drei sich unterscheidende Bereiche erkennen. Der erste (obere) ist der normale Faserverlauf der Sehne, der zweite (mittlere) eine starke Proliferationszone mit dunkelblau gefärbten Zellkernen und der dritte (untere) Bereich zeigt den äußeren Randbereich der EZM mit schwarz granulierten Arealen, entsprechend einer Mineralisierungszone. Zusätzlich lässt sich ein weiß gefärbter, im linken Bildausschnitt, homogener Bereich feststellen, der einer Übergangszone entsprechen könnte.

In der Abb. B ist ein blassrosa gefärbter Bereich zu erkennen, mit einzelnen Zellkernen, der einer Osteoidansammlung entsprechen kann. Um diesen herum sind, im unteren Bildausschnitt, blassrosa gefärbte Bereiche zu erkennen, die noch vereinzelte Zellkerne aufweisen und einzelne Sehnenfasern enthalten. Dieser Bereich könnte einer sog. Übergangszone entsprechen, in dem es im späteren Verlauf zu Osteoidablagerungen hätte kommen können. Ebenfalls zu erkennen ist eine Proliferationszone mit Zellkernen, im oberen Bildausschnitt, die dunkelblau angefärbt sind.

4.5.4. Färbeergebnisse der Gruppe 3

In der Abb. 51 sind die Sehnen der Gruppe 3 (Sehne+BMP7) aus der gesamten Versuchszeit aufgezeigt. Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme der EZM im Verlauf vom 1. zum 3. Monat, wie auch vermehrte Osteoidablagerungen in diesen Bereichen.

Im 1. und 2. Monat sind zudem noch kalkähnliche Einschlüsse innerhalb der EZM zu beobachten, wobei diese im 2. Monat vermehrt auftreten.

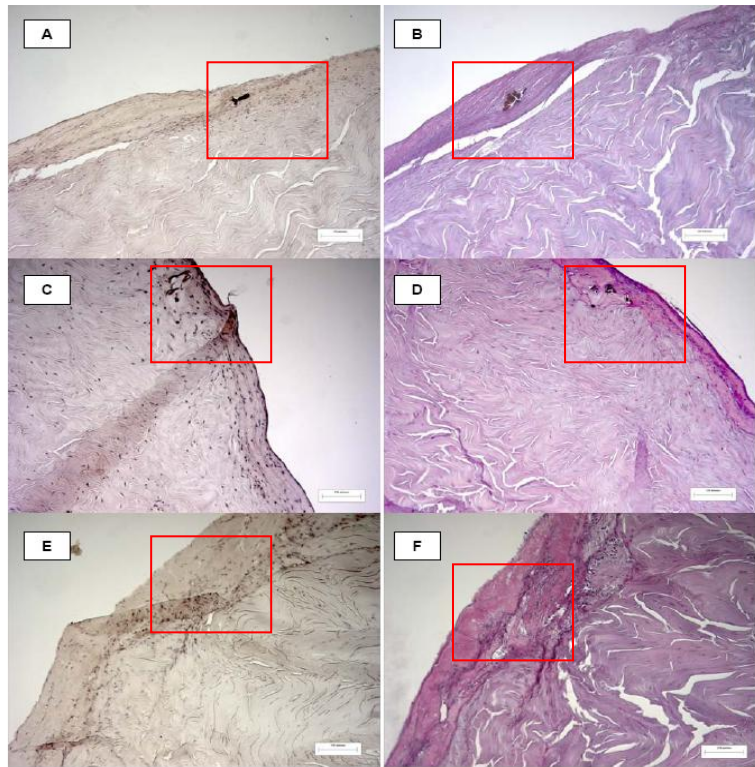


Abb. 51: Sehnen der **Gruppe 3** (Sehne+BMP-7) nach histologischer Färbung nach v. Kossa und PAS. **A u. B:** 1. Monat, **C u. D:** 2. Monat, **E u. F:** 3. Monat. Die rot umrandeten Bereiche sind in den Abb. 52, 53 und 54 vergrößert dargestellt.

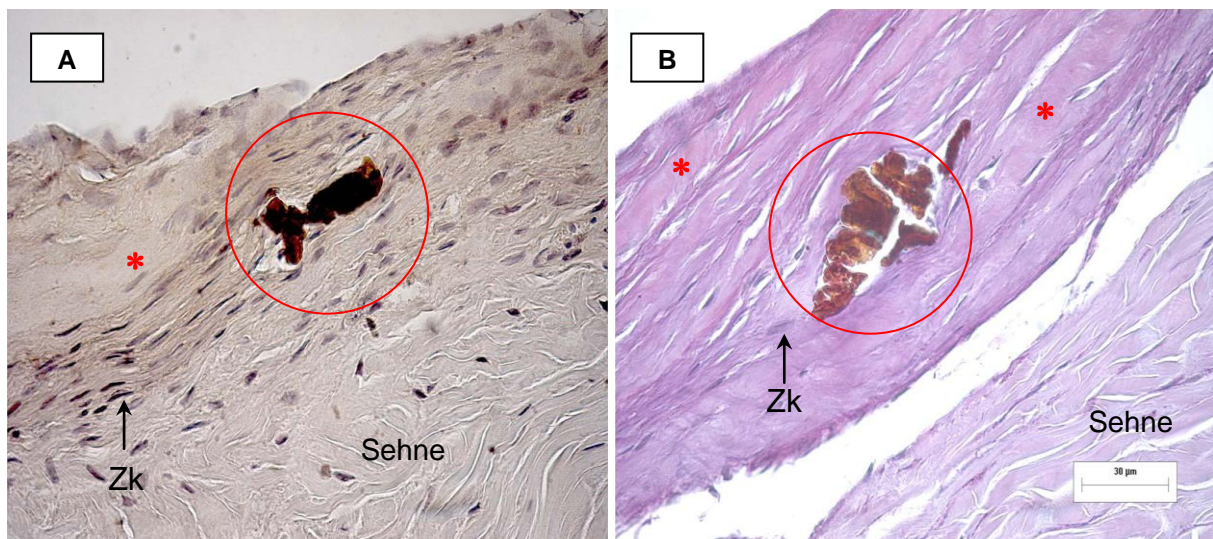


Abb. 52: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 3** (Sehne+BMP-7) nach einer Versuchszeit von **4 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (40er Objektiv). Die in der Gruppe 3 vorhandenen Kalkeinschlüsse sind mittels eines roten Kreises, die Osteoid-Ablagerungen durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Zellkerne (Zk). Zu erkennen sind im oberen Anteil der Abb. mögliche Osteoidablagerungen, die durch die blasse, bzw. hellrosa Färbung und die vereinzelt Zellkernansammlungen auffallen. Jeweils in beiden Abb. sind zudem kalkähnliche Einschlüsse in der EZM dargestellt.

Die Abb. 52 zeigt eine Sehne nach einem Monat Kultivierungszeit. In Abb. A sind neben dem normalen Faserverlauf, im unteren Bildausschnitt, noch zwei Strukturen zu erkennen: eine homogene, weiß gefärbte Struktur, die mögliche Osteoidablagerungen enthält und ein zellkernreiches, darunter gelegenes Areal. Zusätzlich ist ein kalkähnlicher Einschluss zu erkennen, der dunkelbraun-schwarz gefärbt ist.

Die Abb. B lässt ebenfalls im unteren Bildabschnitt den normalen Faserverlauf der Sehne erkennen. Im Bereich der EZM durchziehen blassrosa gefärbte Areale die gesamte Matrix, die einer Osteoidablagerung entsprechen kann. Zusätzlich ist auch hier der kalkähnliche Einschluss in der Bildmitte zu erkennen.

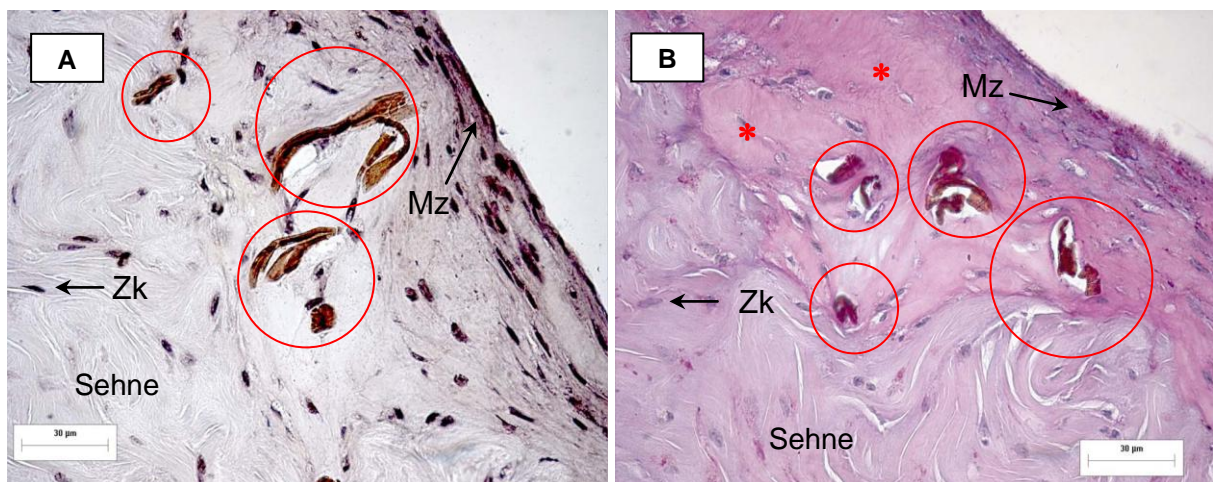


Abb. 53: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 3** (Sehne+BMP-7) nach einer Versuchszeit von **8 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (40er Objektiv). Die in der Gruppe 3 vorhandenen Kalkeinsschlüsse sind mittels eines roten Kreises, die Osteoid-Ablagerungen durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Mineralisierungszone (Mz), Zellkerne (Zk). Zu erkennen sind im oberen Anteil der Abb. Osteoidablagerungen und darüber liegend Mineralisierungszonen, mit vermehrten Zellkernansammlungen. Jeweils in beiden Abb. sind zudem mehrere kalkähnliche Einschlüsse in die EZM dargestellt.

In der Abb. 53 sind Sehnenpräparate nach dem 2. Monat abgebildet. Abb. A zeigt einige kalkähnliche Einschlüsse in der EZM. Zusätzlich ist eine, im oberen Bildausschnitt dargestellte, schwarz granulierte Zone, mit Reihen dunkelrot bis schwarz gefärbter Zellkerne zu erkennen, entsprechend einer Mineralisierungszone. Zudem zeigen sich einige homogene, weiß gefärbte Areale innerhalb der EZM, die Osteoidansammlungen enthalten. Im unteren Bildausschnitt ist der normale Sehnenverlauf zu erkennen.

In der Abb. B sind zahlreiche große blassrosa gefärbte Osteoidansammlungen innerhalb der EZM zu erkennen sowie eine bläulich-lila gefärbte Mineralisationszone und mehrere kalkähnliche Einschlüsse. Zudem ist der normale Faserverlauf der Sehnen im unteren Bildabschnitt abgebildet.

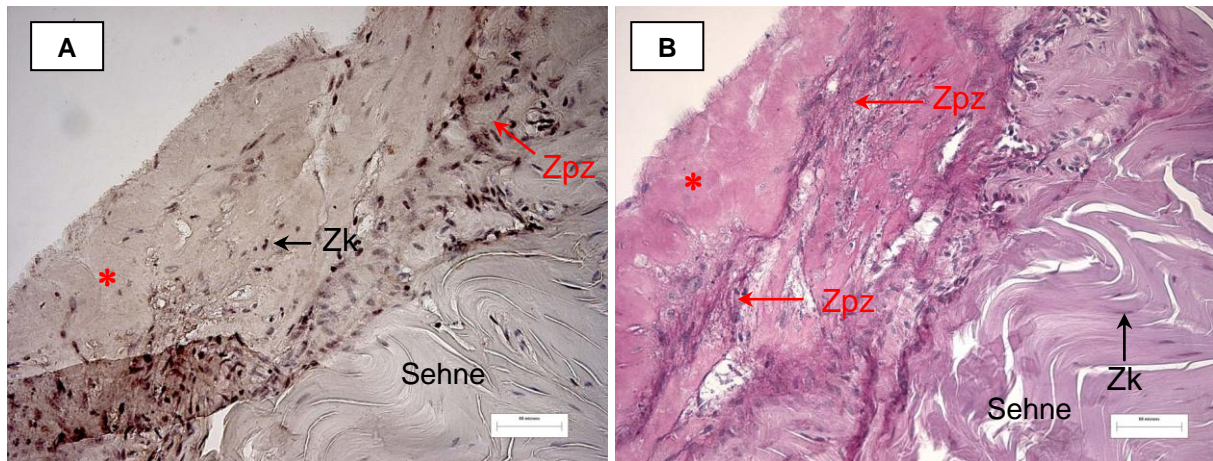


Abb. 54: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 3** (Sehne+BMP-7) nach einer Versuchszeit von **11 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (20er Objektiv). Die in der Gruppe 3 vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Mineralisierungszone (Mz), Zellkerne (Zk), Zellproliferationszone (Zpz).

Zu erkennen sind im oberen Anteil der Abb. mögliche Osteoidablagerungen, die durch die blasse, bzw. hellrosa Färbung und die vereinzelt Zellkernansammlungen auffallen.

Die Abb. 54 zeigt Sehnen nach einer Kultivierungszeit von 3 Monaten. In der Abb. A ist eine durchgehende, stark ausgeprägte EZM im linken Bildausschnitt zu erkennen. In dieser finden sich Bereiche mit gehäuft Zellkernansammlungen, die sog. Zellproliferationszonen entsprechen. Zudem lassen sich homogene, blass gefärbte, zellfreie Areale erkennen. Diese können mögliche Osteoidansammlungen darstellen. Zudem ist der normale Sehnenverlauf im rechten Bildausschnitt zu erkennen.

Die Abb. B weist im linken Bildausschnitt zahlreiche blassrosa gefärbte, zellarme Areale auf, die starken Osteoidablagerungen entsprechen können. Darunter liegend treten, verteilt in der EZM, vermehrte Zellkernansammlungen auf. Zwischen diesen Zellproliferationszonen sind auch vereinzelt Osteoidablagerungen zu erkennen. Im rechten Bildausschnitt ist der normale Sehnenverlauf abgebildet.

4.5.5. Färbeergebnisse der Gruppe 4

Abb. 55 gibt einen Überblick über den Verlauf der Sehnen aus der Gruppe 4 (Sehne) während des gesamten Versuchszeitraums von 3 Monaten.

Wesentliche Unterschiede lassen sich in der Übersicht nicht darstellen. Größere EZM-Bildungen oder Osteoidansammlungen sind nicht zu erkennen. Ebenso kommt es zu keinem Zeitpunkt zu einem Auftreten von kalkähnlichen Einschlüssen oder Verkalkungsprozessen.

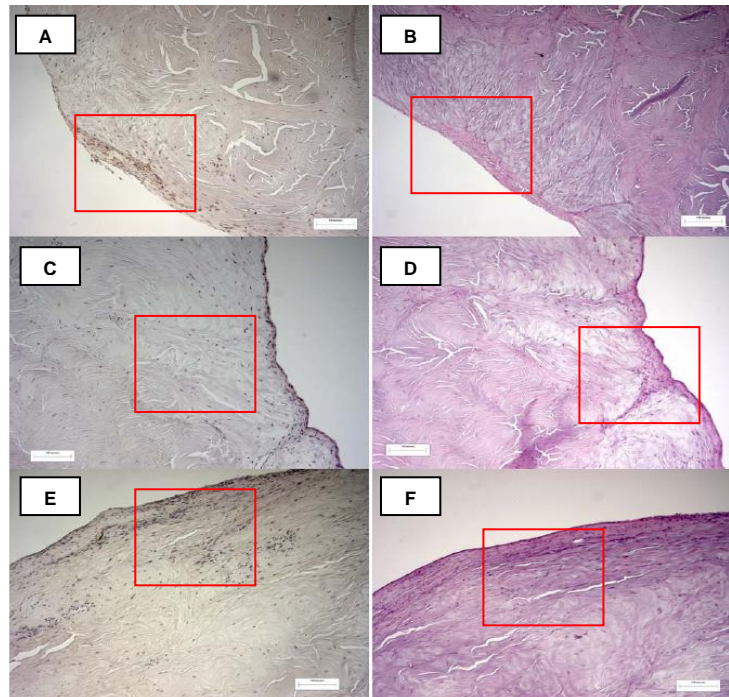


Abb. 55: Sehnen der **Gruppe 4** (Sehne) nach histologischer Färbung nach v. Kossa und PAS. **A u. B:** 1. Monat, **C u. D:** 2. Monat, **E u. F:** 3. Monat. Die rot umrandeten Bereiche sind in den Abb. 56, 57 und 58 vergrößert dargestellt.

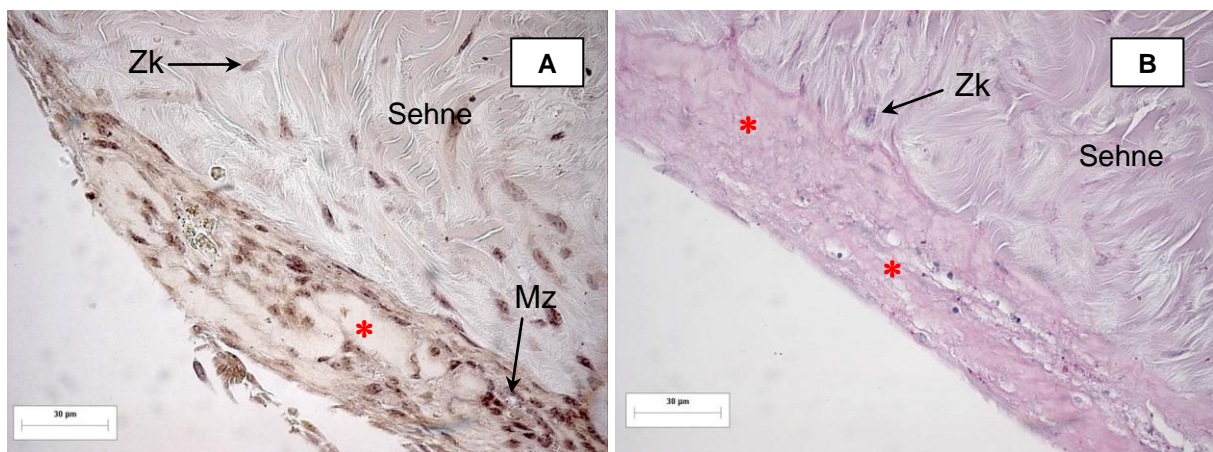


Abb. 56: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 4** (Sehne) nach einer Versuchszeit von **4 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (40er Objektiv). Die in der Gruppe 4 möglich vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Mineralisierungszone (Mz), Zellkerne (Zk). Zu erkennen sind im oberen Bildabschnitt der normale Sehnenverlauf und darunter gelegen ein Ausschnitt der EZM. In dieser befinden sich hell, bzw. blass rosa gefärbte Areale, die Osteoidablagerungen entsprechen können.

In der Abb. 56 sind Sehnenpräparate aus dem ersten Monat abgebildet. Die Abb. A zeigt im unteren Bildausschnitt die EZM, die auf der Sehne jedoch nur einen kleinen Teil ausmacht. Zu sehen ist neben dem normalen, im oberen Bildausschnitt vorhandenen, Faserverlauf, ein

Bereich mit dunkelroten Zellkernen und mitunter schwarz granulierten Arealen, die beginnenden Mineralisierungszonen entsprechen können. Zudem sind homogene, zellfreie weißliche Bereiche zu erkennen, die mögliche Osteoidablagerungen enthalten können.

Abb. B zeigt im unteren Bildabschnitt, einen blassrosa gefärbten, zellfreien Bereich innerhalb der EZM, diese Bereiche könnten einer beginnenden Osteoidansammlung entsprechen. Darüber ist der normale Faserverlauf der Sehne zu erkennen.

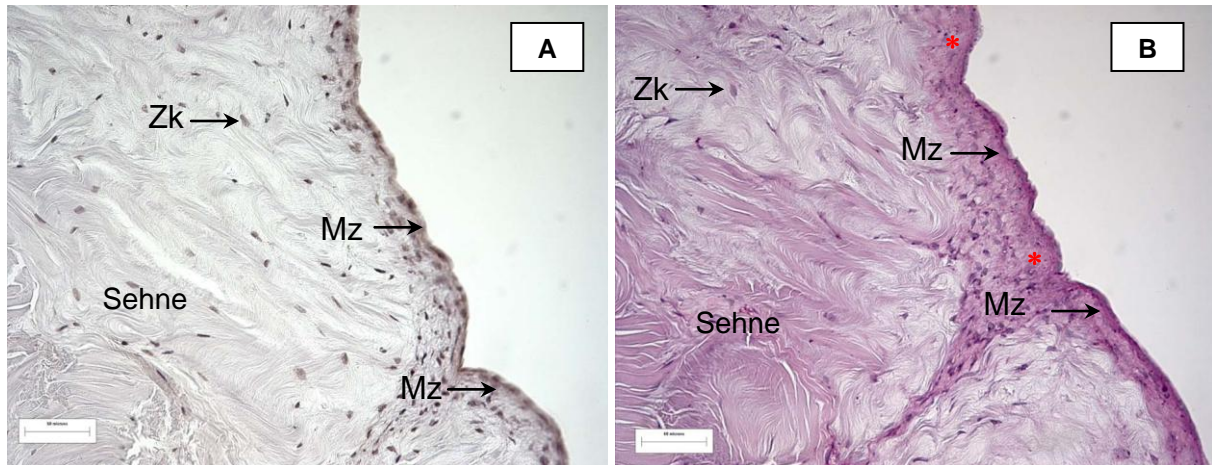


Abb. 57: Darstellung einer Sehne der **Gruppe 4** (Sehne) nach einer Versuchszeit von **8 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (20er Objektiv). Die in der Gruppe 4 möglich vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Mineralisierungszone (Mz), Zellkerne (Zk). Zu erkennen sind im linken Bildabschnitt der normale Sehnenverlauf und daneben gelegen ein Ausschnitt der EZM. In dieser befinden sich vereinzelte hell, bzw. blass rosa gefärbte Areale, die Osteoidablagerungen entsprechen können.

Die Abb. 57 zeigt Sehnen nach einer Kultivierungszeit von 2 Monaten. Dabei zeigt Abb. A eine schmale EZM (im rechten Bildausschnitt) mit teilweise schwarz granulierten Arealen am Randbereich, was ein Hinweis für eine Mineralisierungszone sein kann. Der normale Faserverlauf der Sehne ist im linken Bildabschnitt zu sehen.

Abb. B lässt erkennen, dass die EZM im rechten Bildausschnitt etwas stärker ist, als sie in Abb. A dargestellt ist. Die EZM stellt sich hier als dunkellila gefärbter Bereich dar, der mitunter blassrosa gefärbte Areale aufweist und somit ein Hinweis für Osteoidansammlungen sein könnte. Bedingt dadurch, dass sich in diesem Bereich noch viel zelluläres Material befindet, ergibt sich im gesamten Bild der EZM ein verwaschener Charakter. Auch hier ist der normale Faserverlauf im linken Bildabschnitt zu erkennen.

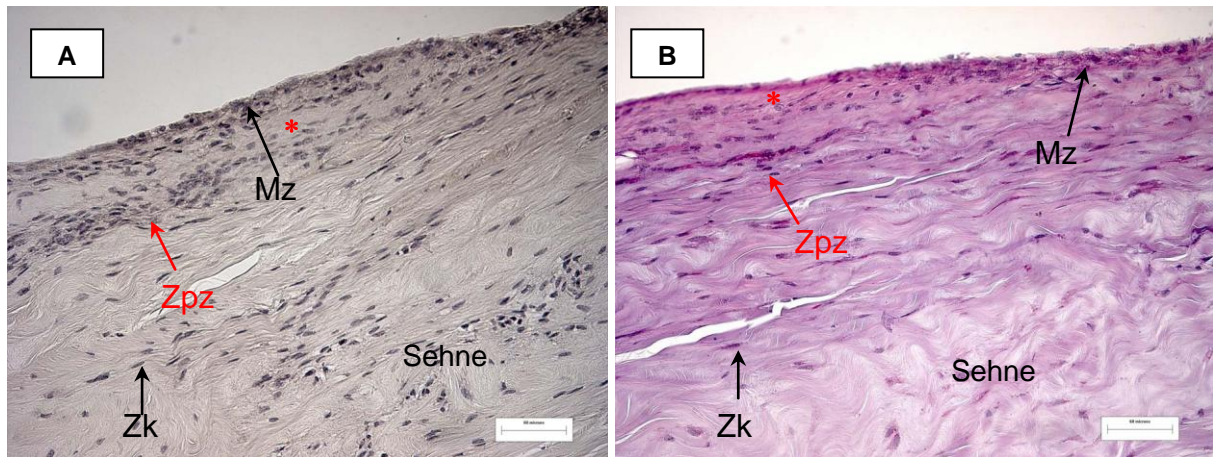


Abb. 58: Darstellung der EZM einer Sehne der **Gruppe 4** (Sehne) nach einer Versuchszeit von **11 Wochen**. A: v. Kossa-Färbung; B: PAS-Färbung (20er Objektiv). Die in der Gruppe 4 möglich vorhandenen Osteoid-Ablagerungen sind durch einen roten Stern (*) hervorgehoben worden. Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Mineralisierungszone (Mz), Zellkerne (Zk), Zellproliferationszone (Zpz).

Zu erkennen sind im unteren Bildabschnitt der normale Sehnenverlauf und darüber gelegen ein Ausschnitt der EZM. In dieser befinden sich vereinzelte hell, bzw. blass rosa gefärbte Areale, die Osteoidablagerungen entsprechen können sowie diffus verteilt vermehrte Zellkernansammlungen.

In der Abb. 58 sind die Sehnen nach einer Versuchslaufzeit von 3 Monaten abgebildet. Abb. A zeigt eine starke Ansammlung von Zellkernen (obere Bildausschnitt) im Bereich der EZM. Zudem befinden sich am Rand vereinzelt schwarz granulierte Bereiche, die sog. Mineralisierungszonen entsprechen können. Homogene, zellfreie, weiße Areale finden sich vereinzelt.

In Abb. B ist ein stark lila gefärbter Bereich am äußeren Rand der EZM zu erkennen. Zusätzlich sind auch hier vermehrte Zellkernansammlungen dargestellt, die Zellkerne sind hier dunkelviolettfärbt. Vereinzelt zeigen sich blass rosa gefärbte Areale in diesem Bereich, die Osteoid-Ablagerungen entsprechen können. Zudem ist, wie in Abb. A, der normale Faserverlauf der Sehne im unteren Bildabschnitt zu erkennen.

4.5.6. Allgemeine Aspekte der Färbeergebnisse

Zusammenfassend ist bei den Sehnen die eine BMP-7 Applikation erhalten haben (Gruppe 1 und 3) ein positiver Effekt durch die BMP-7 Gaben zu beobachten. Dieser zeigt sich zum einen in der Gestalt, dass es viel früher zu einer Bildung der EZM kommt, die zudem auch stärker ausgeprägt ist (siehe hierzu Abb. 40-42) und zum anderen daran, dass diese Gruppen auch eine frühe und stärker ausgeprägte Bildung von Osteoid aufweisen (siehe hierzu Abb. 45B, 46B, 53B und 54B). Ebenso weisen nur die Gruppen mit BMP-7 kalkähnliche Einschlüsse auf (siehe hierzu Abb. 46A und B, 52A und B und 53 A und B).

Sicherlich weisen auch die Gruppen die keine BMP-7 Applikation erhalten haben (Gruppe 2 und 4) solche Veränderungen auf, diese sind aber viel geringer ausgeprägt und treten auch sehr viel später auf, meist erst im letzten Monat des Versuchs. So sind Osteoid-Ablagerungen in der Gruppe 2 (Sehne+OB) erst im 3. Monat zu erkennen (siehe Abb. 50A und B), ebenso ist ein starker Zuwachs an EZM ebenfalls erst im 3. Monat zu erkennen (siehe Abb. 47). In der Gruppe 4 (Sehne) sind dagegen solche Veränderungen nicht wirklich zu beobachten. Einzig vermehrte Zellkernansammlungen lassen sich im Verlauf erkennen (siehe Abb. 58 A und B).

4.6. Ergebnisse aus der Rasterelektronenmikroskopie

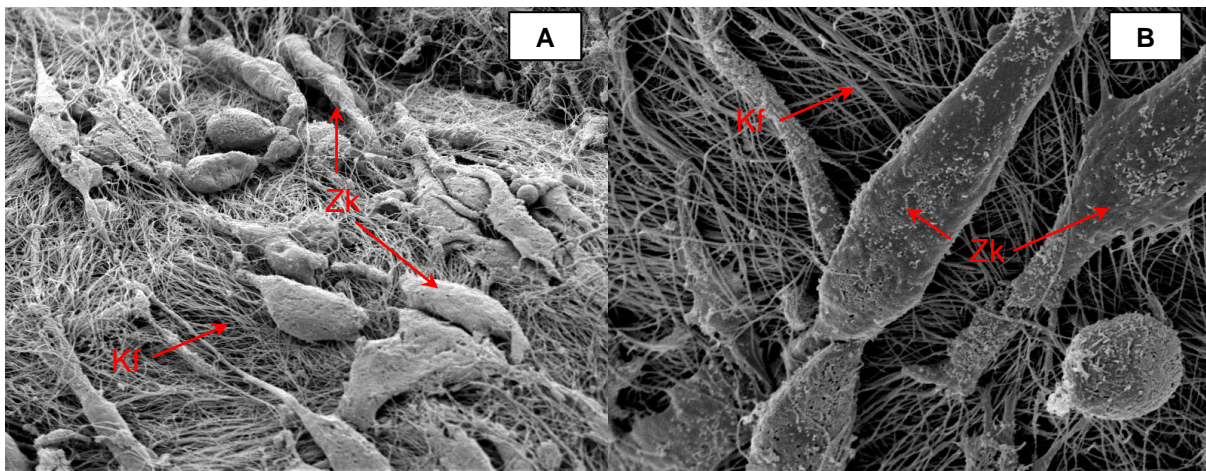


Abb. 59: REM-Darstellung von Sehnen **ohne BMP-7 Applikation** nach einer Versuchszeit von **4 Wochen**. **A:** Sehne aus Gruppe 2 (Sehne+OB); **B:** Sehne aus Gruppe 4 (Sehne). Abkürzungen: Kollagenfibrillen (Kf), Zellkörper (Zk)

In beiden Abbildungen sind noch zahlreiche Kollagenfibrillen zu erkennen. Auf diesen liegen vereinzelte Zellen, die z.T. miteinander verbunden sind. Ob es sich dabei um OB oder FB handelt lässt sich nicht beurteilen.

Die Abb. 59 zeigt zwei Sehnen nach einer Kultivierungszeit von einem Monat. In Abb. A ist eine Sehne der Gruppe 2 (Sehne+OB) und in Abb. B eine Sehne der Gruppe 4 (Sehne) abgebildet. Die Abbildungen A und B sind relativ identisch. Zu erkennen sind die noch reichlich vorhandenen Kollagenfibrillen der Sehne und, darauf sich ansiedelnd, vereinzelte Zellen, die zum Teil miteinander vernetzt sind. Ob es sich dabei um Osteoblasten oder Fibroblasten handelt, lässt sich nicht beurteilen.

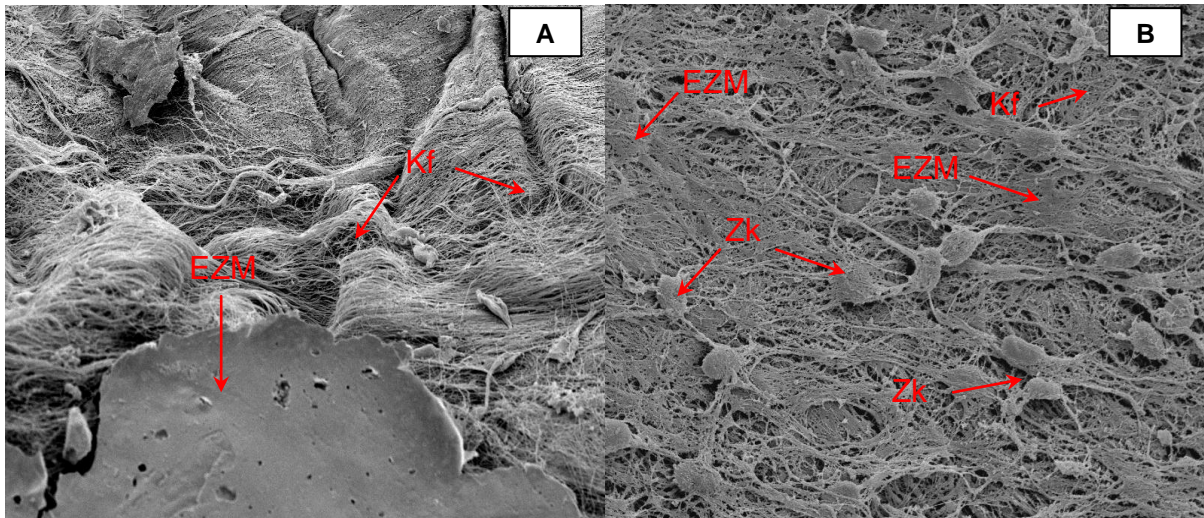


Abb. 60: REM-Darstellung von Sehnen **mit BMP-7 Applikation** nach einer Versuchszeit von **4 Wochen**. **A:** Sehne aus Gruppe 3 (Sehne+BMP-7); **B:** Sehne aus Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7). Abkürzungen: Extrazelluläre-Matrix (EZM), Kollagenfibrillen (Kf), Zellkörper (Zk).

In Abb. A zeigt sich im unteren Bildabschnitt eine starke EZM, im restlichen Präparat sind noch Kollagenfibrillen zu erkennen. Die EZM in Abb. B ist nicht so flächendeckend, dafür finden sich noch vereinzelte Zellkörper auf der Oberfläche.

Die Abb. 60 zeigt zwei Sehnen nach einer Kultivierungszeit von einem Monat, die eine BMP-7 Applikation erhalten haben. In Abb. A ist eine Sehne der Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) zu sehen. Hier ist im unteren Bildabschnitt eine starke EZM-Bildung zu erkennen, wie auch noch vereinzelte Kollagenfibrillen.

Die Abb. B zeigt eine Sehne der Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7). Hier ist eine aufgelockerte EZM zu erkennen mit Ansiedlung von einigen Zellen auf der EZM. Darunter sind noch die Kollagenfibrillen zu erkennen.

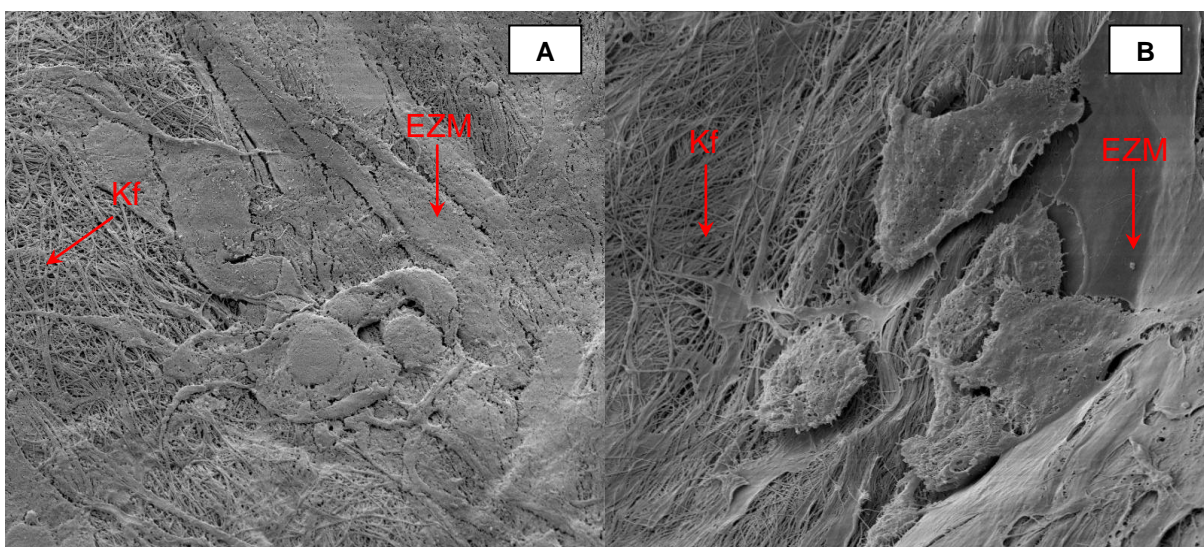


Abb. 61: REM-Darstellung von Sehnen **ohne BMP-7 Applikation** nach einer Versuchszeit von **8 Wochen**. **A:** Sehne aus Gruppe 2 (Sehne+OB); **B:** Sehne aus Gruppe 4 (Sehne). Abkürzungen: Extrazelluläre-Matrix (EZM), Kollagenfibrillen (Kf).

Im Wesentlichen identische Abbildungen. Zu erkennen sind ausgeprägte EZM-Plaques. Vereinzelt sind darunter die Kollagenfibrillen zu sehen.

Abb. 61 zeigt in Abb. A eine Sehne der Gruppe 2 (Sehne+OB) und in Abb. B eine Sehne der Gruppe 4 (Sehne) nach einer Versuchslaufzeit von 2 Monaten. In beiden Abbildungen sind EZM-Bildungen zu erkennen, die aber noch nicht komplett die Sehne bedecken, sondern noch den Blick auf die darunter liegenden Kollagenfibrillen ermöglichen. Wesentliche Unterschiede zeigen sich nicht auf.

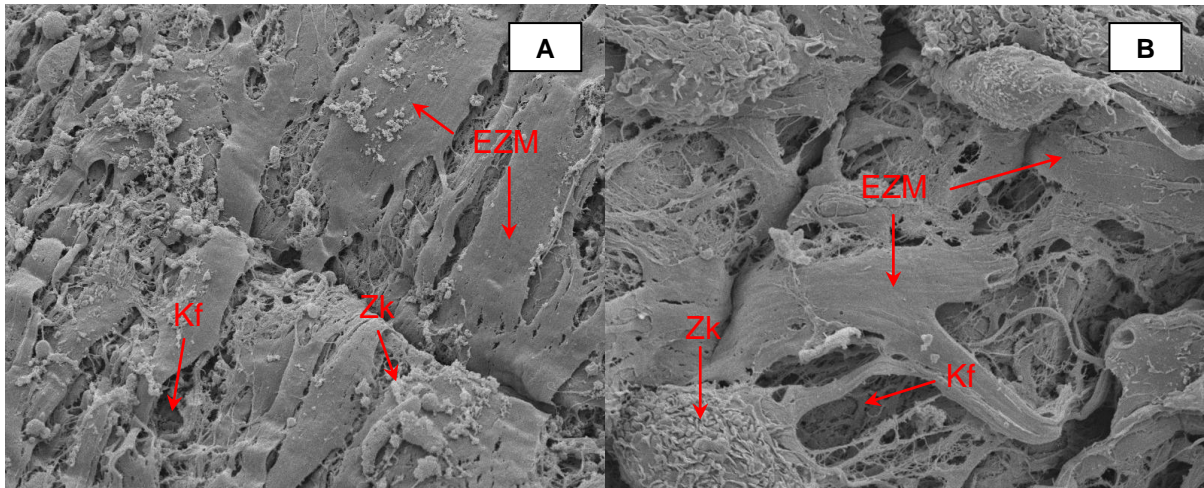


Abb. 62: REM-Darstellung von Sehnen **mit BMP-7 Applikation** nach einer Versuchszeit von **8 Wochen** **A:** Sehne der Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7); **B:** Sehne der Gruppe 3 (Sehne+BMP-7). Abkürzungen: Extrazelluläre-Matrix (EZM), Kollagenfibrillen (Kf), Zellkörper (Zk). In beiden Abbildungen sind starke EZM-Plaques abgebildet. Darunter kommen vereinzelt Kollagenfibrillen zum Vorschein. Auf den EZM-Plaques sind vereinzelt Zellansammlungen zu sehen,

Die Abb. 62 zeigt zwei Sehnen mit einer BMP-7 Applikation nach dem 2. Monat. In Abb. A ist eine Sehne der Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7) dargestellt. Zu erkennen sind ausgedehnte EZM-Plaques, die mit zahlreichen Zellen besiedelt sind.

Ähnliches zeigt auch die Abb. B, in der eine Sehne der Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) abgebildet ist. Wesentliche Unterschiede sind hierbei nicht zu erkennen. In beiden Abb. sind noch vereinzelt Kollagenfibrillen zu sehen. Im Vergleich zur Abb. 61 sind hier stärkere EZM-Plaques zu erkennen, die durch die BMP-7 Gaben bedingt sein könnte

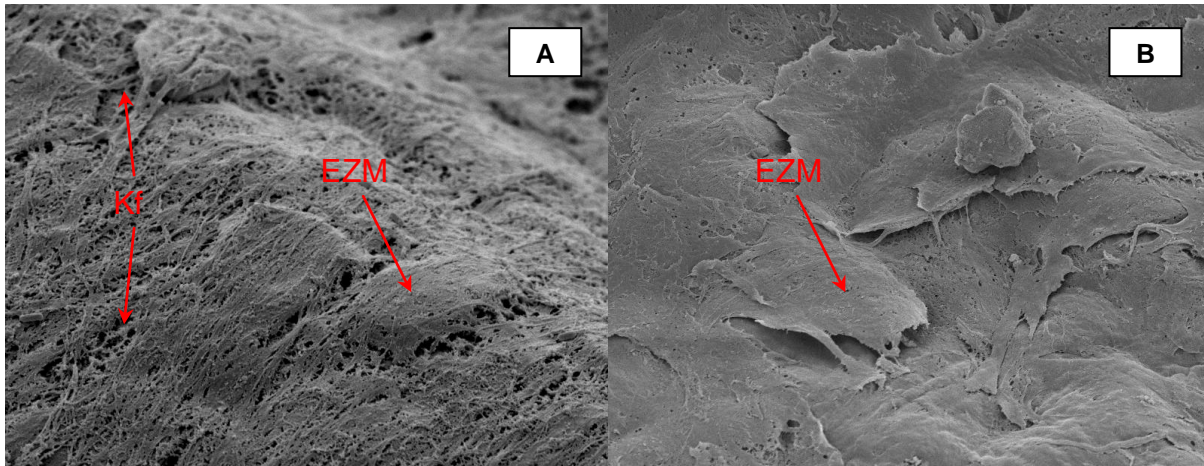


Abb. 63: REM-Darstellung von Sehnen **mit und ohne BMP-7 Applikation** nach einer Versuchszeit von **11 Wochen**. **A:** Sehne der Gruppe 2 (Sehne+OB); **B:** Sehne der Gruppe 1 (Sehne+OB+BMP-7). Abkürzungen: Extrazelluläre-Matrix (EZM), Kollagenfibrillen (Kf).

In der Abb. 63 sind zwei Sehnen nach einer Kultivierungszeit von drei Monaten abgebildet. Die Abb. A zeigt hierbei eine Sehne aus der Gruppe 2 (Sehne+OB). Hier ist eine fast vollständige Bedeckung der Sehne mit EZM zu erkennen, vereinzelt sind noch die Kollagenfibrillen zu erkennen.

Bei der Sehne in Abb. B (Sehne+OB+BMP-7) ist die EZM gleichmäßig über die gesamte Sehne verteilt und nicht so inhomogen, wie in Abb. A. Siehe in diesem Zusammenhang auch Abb. 64. A und B.

Die Sehne der Gruppe 4 hat sich im Vergleich zum 2. Monat nicht wesentlich verändert und ist deshalb nicht abgebildet. Bei der Sehne aus der Gruppe 3 sind ähnliche Veränderungen wie bei der Gruppe 1 zu beobachten und werden daher ebenfalls nicht abgebildet.

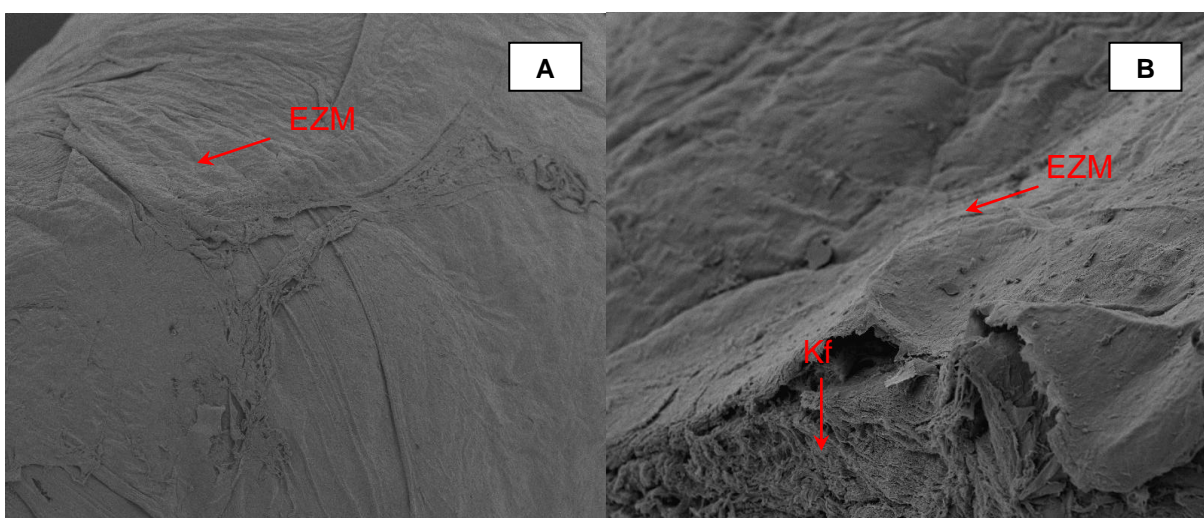


Abb. 64: REM-Darstellung einer Sehne der **Gruppe 1** (Sehne+OB+BMP-7) nach einer Versuchszeit von **11 Wochen**. Abkürzungen: Extrazelluläre-Matrix (EZM), Kollagenfibrillen (Kf). In Abb. A ist die gesamte Sehne konfluent von EZM überzogen. Es sind keine Kollagenfibrillen zu erkennen. Nur die Abb. B zeigt aufgrund des Querschnitts unter der EZM die Kollagenstruktur der Sehne.

4.7. Ergebnisse aus der Fotodokumentation

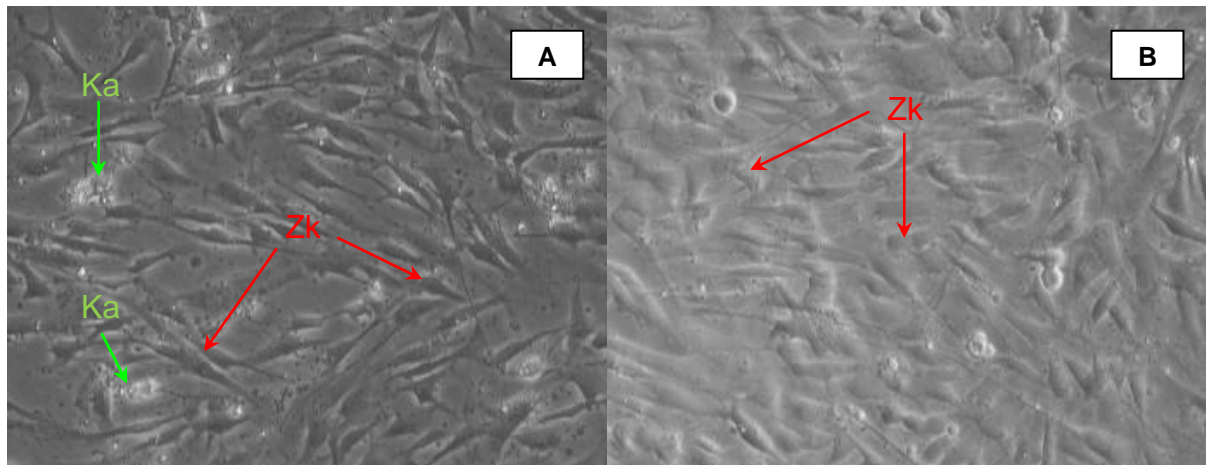


Abb.65: Darstellung von **Zellkulturen** nach einer Kultivierungszeit von **8 Tagen**; **A**: Gruppe 1 (OB+BMP-7), (200xmag. 348x258p); **B**: Gruppe 2 (OB), (200xmag. 348x258p). Abkürzungen: Kalzifizierungsablagerungen (Ka), Zellkörper (Zk). Beide Abb. weisen eine semikonfluente Besiedlung der Kulturschalen auf. Nur in der Gruppe 1 (Abb. A) sind Kalzifizierungsablagerungen zu erkennen.

Die Abb. 65 zeigt zwei Kulturschalen nach einer Kultivierungszeit von 8 Tagen. Abb. A zeigt eine Kulturschale der Gruppe 1 (OB+BMP-7). Zu erkennen ist ein semikonfluenter Zellrasen mit vereinzelt kleinen Kalzifizierungsablagerungen. Die Abb. B zeigt eine Kulturschale der Gruppe 2 (OB) nach einer Kultivierungszeit von 8 Tagen. Auch hier ist ein semikonfluenter Zellrasen zu erkennen. Im wesentlichen besteht kein Unterschied zu der Gruppe 1. Auch die Gruppe 3 (FB+BMP-7) und 4 (FB) sowie auch Gruppe 5 (FB+OB+BMP-7) und Gruppe 6 (FB+OB) zeigen ein sehr ähnliches Bild. Nodules oder ausgeprägte EZM-Bildungen sind dabei in allen Gruppen noch nicht zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt hat eine BMP-7 Applikation noch nicht sattgefunden, diese erfolgte erst ab dem 12. Versuchstag.

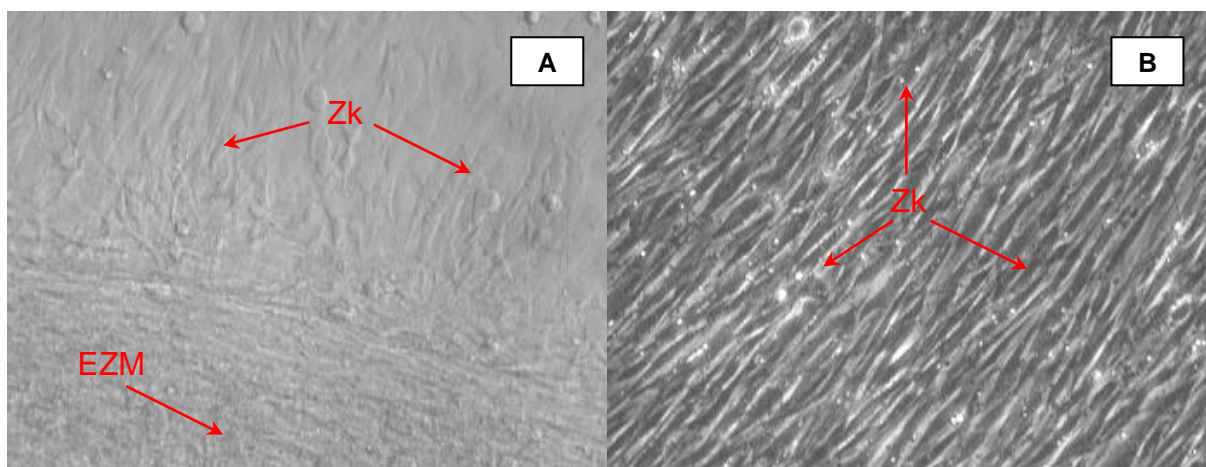


Abb. 66: Darstellung von **Zellkulturen** nach einer Kultivierungszeit von **16 Tagen**; **A**: Gruppe 1 (OB+BMP-7), (200xmag.348x258p); **B**: Gruppe 5 (FB+OB+BMP-7), (200xmag. 348x258p). Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Zellkörper (Zk). Beide Abb. weisen eine konfluente Besiedlung der Kulturschalen auf. In Abb. A ist zudem eine EZM zu erkennen.

In Abb. 66 sind zwei Kulturschalen nach einer Kultivierungszeit von 16 Tagen fotografiert. Die Abb. A zeigt eine Kulturschale der Gruppe 1 (OB+BMP-7) nach einer zweimaligen BMP-7 Applikation. Zu erkennen ist eine starke EZM-Bildung sowie ausgehend von der EZM die Neubesiedlung neuer Zellen, die fast schon einen konfluenten Zellrasen bilden.

In der Abb. B ist eine Kulturschale der Gruppe 5 (FB+OB+BMP-7) zu erkennen. Auch hier erfolgte die zweimalige Applikation von BMP-7. Es ist ein dichter Zellrasen zu erkennen, der ein konfluentes Wachstum aufweist. Eine EZM-Bildung zeigt sich hier noch nicht.

Die Kulturschalen der Gruppe 3 (FB+BMP-7) und Gruppe 4 (FB) zeigen zwar ein gutes Zellwachstum, jedoch ist keine EZM- oder Nodules-Bildung zu erkennen, da dies von FB auch nicht zu erwarten ist.

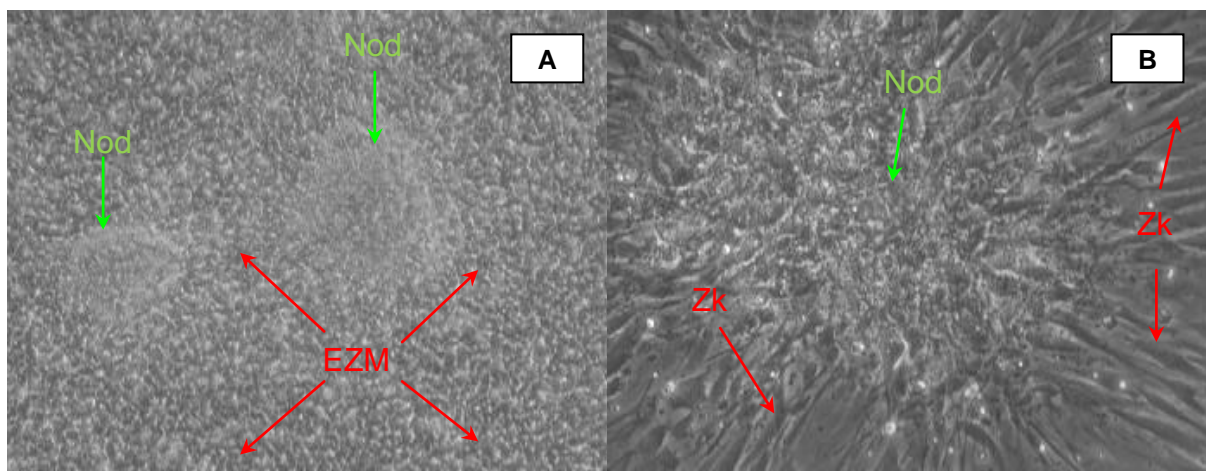


Abb. 67: Darstellung von **Zellkulturen** nach einer Kultivierungszeit von **20 Tagen**; **A**: Gruppe 1 (OB+BMP-7), (200xmag.348x258p); **B**: Gruppe 5 (FB+OB+BMP-7), (200xmag. 348x258p). Abkürzungen: Extrazellulär-Matrix (EZM), Nodules (Nod), Zellkörper (Zk). Deutliche EZM-Bildung und Ausbildung von Nodules in Abb. A. Abb. B mit zentralem Nodule und konfluenten Zellrasen.

In der Abb. 67 sind zwei Kulturschalen nach einer Kultivierungszeit von 20 Tagen abgebildet. Abb. A zeigt die Gruppe 1 (OB+BMP-7) nach einer viermaligen BMP-7 Applikation. Zu erkennen ist eine starke EZM-Bildung sowie zwei Nodules.

Abb. B zeigt die Gruppe 5 (FB+OB+BMP-7) ebenfalls nach einer viermaligen BMP-7 Applikation. Bildmittig ist ein großer Nodule zu erkennen sowie diesen umgebend ein konfluierender Zellrasen. Die EZM ist im Vergleich zur Gruppe 1 geringer ausgeprägt aber vorhanden (auf der Abb. jedoch aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt).

Die Gruppen ohne eine BMP-7 Applikation, Gruppe 2 (OB) und Gruppe 6 (FB+OB), weisen ein gutes Zellwachstum auf. Teilweise wurde auch eine EZM gebildet. Nodules-Bildung oder beginnende Kalzifizierungsherde sind jedoch nicht zu beobachten. Ein ähnliches Bild zeigen auch die Kulturschalen der Gruppe 3 (FB+BMP-7) und Gruppe 4 (FB). Bei diesen Gruppen ist ein z.T. konfluierendes Zellwachstum zu beobachten, jedoch ist immer noch keine EZM-Bildung oder Nodules-Bildung zu erkennen.

5. Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit war es zum einen, die Effekte von BMP-7 auf Osteoblasten und Fibroblasten (Sehnen) in vitro zu untersuchen, mitunter zu quantifizieren und zum anderen dabei eine Methode zu etablieren, die die entsprechenden Fragestellungen beantworten kann. In diesem Zusammenhang wurde für diese Arbeit ein Zellkulturmodell benutzt, bei dem über 10 Wochen die Effekte der BMP-7 Applikation und das Zusammenspiel der beteiligten Zellgruppen untersucht werden konnte. Um diese unterschiedlichen Effekte noch besser voneinander zu unterscheiden, wurden vier Gruppen erstellt, die alle eine bovine Sehne enthielten und je nach Gruppenzugehörigkeit noch mit Osteoblasten und einer BMP-7 Applikation versorgt wurden (siehe auch Abb. 20).

Zur besseren Auswertung und Unterstützung der Aussagekraft wurde in einem zweiten, kürzeren (24 Tage) Zusatzversuch, der Effekt von BMP-7, auf die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen, untersucht. In diesem Versuch wurden keine Sehnen verwendet, sondern ausschließlich Osteoblasten, Fibroblasten und eine Osteoblasten-Fibroblasten-Mischkultur, die je nach Gruppenzugehörigkeit mit BMP-7 versorgt wurden (siehe auch Abb. 21).

Nach der vorbestimmten Kultivierungszeit erfolgte die qualitative und quantitative Bestimmung spezifischer Markerproteine und klinisch chemischer Analyte. Darüber hinaus erfolgte die Anfertigung histologischer und rasterelektronenmikroskopischer Präparate sowie die bildmorphologische Auswertung dieser.

Durch diesen Versuchsaufbau, bestehend aus dem Haupt- und Zusatzversuch, sowie den klinisch-chemischen Bestimmungen und Auswertungen der histologischen und rasterelektronenmikroskopischen Bilder sollten folgende Kernfragen untersucht werden:

1. Wie verläuft das Einwachsverhalten bezüglich der Knochen-Sehnen-Interaktion?
2. Gibt es in diesem Zusammenhang störende Faktoren bei der Interaktion von OB und FB?
3. Können diese Prozesse durch die Gabe von BMP-7 beschleunigt werden?
4. Bestehen neben den proliferativen Eigenschaften von BMP-7 auch hemmende Faktoren?

Als ein zusätzlicher, aber mitunter schwieriger Punkt, stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf die Kreuzbandchirurgie bzw. nach der Übertragung der in vitro gewonnen Ergebnisse auf in vivo erzielbare Effekte.

5.1. Allgemeine Beobachtungen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse aus klinischer Chemie, Histologie und REM lassen einen positiven Effekt einer BMP-7 Applikation erkennen und auch quantifizieren.

So weisen die Gruppen, die BMP-7 erhalten haben, bei der AP-Bestimmung über den gesamten Versuchszeitraum ein höheres Aktivitätsniveau auf als bei den Gruppen, die keine BMP-7 Applikation erhielten. Diese Ergebnisse zeigen sich parallel, sowohl im Haupt- ,als auch im Zusatzversuch und korrelieren, was den osteoinduktiven Effekt von BMP-7 auf OB anbelangt, mit schon bekannten Ergebnissen aus vorherigen Studien^{(41),(57),(102)}.

Die beobachteten Effekte der AP-Bestimmung bei den Fibroblasten sind bislang nicht ausreichend erforscht, um sie mit anderen Studien zu vergleichen, insbesondere was den Effekt einer BMP-7 Applikation anbelangt.

Das niedrige Aktivitätsniveau der AP bei den Gruppen ohne BMP-7, Gruppe 4 im Hauptversuch (Sehne) und Gruppe 4 im Zusatzversuch (FB), ist ein zu erwartender Effekt, da eine osteoinduktive Potenz von Sehnen oder FB allein bislang nicht bekannt ist. Nur im Zusammenspiel mit OB ist bislang ein positiver Effekt auf die Knochen-Sehnen-Interaktion durch Wang et al beschrieben worden⁽⁹⁰⁾, der bei einer OB-FB-Interaktion eine mögliche Zelltransformation beobachten konnte, die zu einer Steigerung der fibro-kartilaginären Strukturen geführt hatte.

Der positive Effekt von BMP-7 auf das Aktivitätsniveau der AP in der Gruppe 3 des Hauptversuchs (Sehne+BMP-7) und der Gruppe 3 im Zusatzversuch (FB+BMP-7) sind jedoch bislang nicht beobachtet oder dokumentiert worden. Zwar hat Yamada et al durch die Applikation von BMP-7 eine Steigerung des Matrix Metabolismus von FB beschrieben, diesen aber über die Bestimmung von Kollagen und Proteoglykangehalt nachgewiesen und nicht über die AP-Aktivität⁽⁹⁹⁾, so dass hier durch die BMP-7 Gabe ein positiver Effekt auf die Produktion von AP auch bei FB vermutet werden könnte.

Ähnliche Ergebnisse weisen auch die Bestimmungen des OCN-Gehalts auf. Auch hier ist ein positiver Effekt auf den OCN-Gehalt durch die Gabe von BMP-7 in den dazugehörigen Gruppen zu erkennen. Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit anderen Studien, die einen stimulierenden Effekt von BMP-7 auf die OCN-Produktion nachgewiesen haben^{(37),(102),(111)} und hier einen positiven Einfluss von BMP-7 nahe legen könnten.

Die Ergebnisse der histologischen Auswertungen des Hauptversuches belegen ebenfalls einen sichtbaren Effekt einer BMP-7 Applikation. So zeigte sich in den Gruppen, die BMP-7 erhielten (Gruppe 1 und 3), im Verlauf vom 1. bis zum 3. Monat eine deutliche Zunahme der EZM mit Mineralisierungszonen und Osteoid-Ablagerungen, während in den Gruppen ohne BMP-7 (Gruppe 2 und 4) die Ausbildung der EZM viel langsamer vonstatten ging und Osteoid und Mineralisierungszonen mitunter sehr rar waren.

Auch hier ist der Vergleich schwierig, weil bislang fast keine in-vitro-Langzeitstudien mit Sehnen durchgeführt worden sind. Die in anderen tierexperimentellen Studien gewonnen histologischen Präparate stellen zudem meist Ausschnitte aus direkten Knochen-Sehnen-Interface-Bereichen dar oder zeigen Kalzifizierungsnachweise von Zellkulturen und nicht, wie in dieser Studie, isolierte Bereiche von kultivierten Sehnen. Dennoch zeigen diese Studien aber ebenfalls einen positiven Einfluss von BMP-7 auf die Mineralisierung und Knochenbildung in den histologischen Präparaten^{(57),(79)} bzw. geben einen Einblick in die Prozesse, die bei einer Transplantateinheilung ohne eine BMP-7 Gabe stattfinden^{(16),(36)}.

In der Auswertung der REM-Bilder des Hauptversuches sind die Effekte einer BMP-7 Gabe schwer zu quantifizieren bzw. auch schwer mit anderen Studien zu belegen oder zu vergleichen. Zu erkennen war aber eine stärkere, schnellere und homogenere EZM-Bildung in den Gruppen, die eine BMP-7 Applikation erhielten. Während in den Gruppen ohne BMP-7 es zwar auch zu einer EZM-Bildung kam, diese aber viel länger bis zur Ausbildung brauchte und inhomogener war, so dass noch im 3. Monat die typischen Kollagenfibrillen an der Oberfläche zu erkennen waren. Auch dies könnte einen positiven Einfluss von BMP-7 auf die Bildung der EZM darstellen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse des Hauptversuches

5.2.1. Vergleich der Analyte aus den Mediumüberständen der einzelnen Gruppen

In der AP-Bestimmung war ein positiver Effekt durch eine BMP-7 Gabe, über den gesamten Versuchszeitraum zu erkennen. Die Gruppen, die BMP-7 erhielten, wiesen im gesamten Verlauf eine höhere AP-Aktivität auf als diejenigen, die keine systemische Applikation von BMP-7 erhielten.

Hierbei zeigten die Gruppen 1 und 3 einen wellenförmigen Verlauf, während die Gruppen 2 und 4, sowie die Kontrollen, eine nahezu konstant niedrige AP-Aktivität aufzeigten.

Der wellenförmige Verlauf der Gruppen 1 und 3 könnte dabei durch verschiedene Mechanismen entstehen. Zum einen erfolgt bei der Applikation von BMP-7 durch dieses selbst die Aktivierung von negativen Rückkopplungsschleifen und Antagonisten, die die Proliferation und Aktivität der OB herunterfahren, wie Miyazono et al⁽⁶⁰⁾, Zhao et al⁽¹⁰⁶⁾, Gaggero et al^{(25),(27)} und Onichtchouk et al⁽⁶⁶⁾ in zahlreichen Studien nachgewiesen haben. Zum anderen werden aber auch von den Zielzellen mitunter Produkte gebildet, die nicht klassischerweise in die Gruppe von Antagonisten gehören oder als negative Rückkopplungsschleife agieren, aber trotzdem hemmende Effekte nachweisen.

Zu diesen Faktoren gehört der Fibroblast-Growth-Factor-23 (FGF23), dem eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung und Matrix Mineralisierung in vitro zugesprochen werden kann, wie Wang et al⁽⁸⁹⁾ und Fukumoto et al⁽²³⁾ zeigten.

Bei der Bestimmung der AP-Aktivität ist zudem sehr interessant, dass auch die Gruppe 3 eine höhere AP-Aktivität aufwies, obwohl in Fibroblasten, respektive Sehnen, die AP Produktion so gut wie gar nicht vorhanden ist oder deutlich geringer ausfällt, als es in OB der Fall ist, wie die Ergebnisse der Gruppe 4 auch aufzeigen. Diese korrelieren letztendlich auch mit Wang et al⁽⁹⁰⁾, der in seiner Arbeit eine mögliche Zell-Transformation von OB-FB-Kulturen beschrieben hatte, die einen positiven Einfluss auf die Produktion von fibro-kartilaginären Strukturen nahmen.

Die LDH-Bestimmung der Gruppen 1 bis 4 diente in dieser Arbeit als ein Marker der Zellaktivität, bzw. Zellproduktivität. Es wurde das Isoenzym LDH 5 bestimmt, was klinisch-chemisch durch eine LDH Elektrophorese unserer Proben bestätigt wurde.

In diesem Zusammenhang war eine gewisse parallele Aktivität zwischen der AP- und der LDH-Aktivität in den Gruppen zu erkennen, die eine BMP-7 Applikation erhielten. In der Gruppe 1 war der Verlauf der beiden Kurven von AP und LDH nahezu identisch, d.h. Aktivitätsanstiege der AP waren gleichbedeutend mit einem Aktivitätsanstieg der LDH und geben somit ein gutes Bild über die Proliferation bzw. den Aktivitätszustand der Zellkultur wieder. Die Gruppe 3 wies ebenfalls eine korrelative Beziehung dieser beiden Analyte auf. Jedoch war hier der Kurvenverlauf der LDH um zwei Wochen vorversetzt, so dass man die Vermutung äußern kann, dass FB, respektive Sehnen, ebenfalls wie OB im Stande sind, AP zu produzieren, dieses aber verzögert tun.

Vergleichbare Ergebnisse aus anderen Studien liegen hierzu leider nicht vor. Die LDH-Bestimmungen der Gruppen 2 und 4 zeigten einen sehr variablen, mitunter wellenförmigen Verlauf, sind aber nicht parallel mit der AP-Aktivität, die bei diesen beiden Gruppen konstant niedrig blieb.

Die Lactat-Bestimmung wies in allen Gruppen einen, in der Tendenz, abnehmenden Verlauf auf und lag im gesamten Versuchszeitraum bei einem Mittel um ca. 13 mmol/l. Diese Ergebnisse zeigen, dass der MW im Abstand von zwei Tagen richtig gewählt war und die Zellkulturen nicht in ein azidotisches Milieu abrutschten. Die zu tolerierende Lactatkonzentration in dieser Zellkultur wurde vorher mittels eines MTT-Tests ermittelt und auf < 20 mmol/l festgelegt. Werte > 20 mmol/l bremsen die Proliferation der Zellkultur und lassen zudem vermehrt Zellen absterben. Dies konnte in der vorliegenden Studie jedoch gänzlich vermieden werden.

Der OCN-Gehalt der Gruppen mit einer BMP-7 Applikation war über den gesamten Versuchszeitraum höher als der der Gruppen ohne BMP-7. Dabei wies die Gruppe 1 einen wellenförmigen Verlauf, mit einer zum Versuchsende abnehmenden Tendenz, auf. Während die Werte der Gruppe 1 mit anderen Studien übereinstimmen^{(25),(31),(80)}, überraschten die Ergebnisse der Gruppe 3 wieder. Auch hier ist ein höherer OCN-Gehalt nachgewiesen worden als in den Gruppen, die keine BMP-7 Gabe erhielten. Diese Beobachtung ist, ähnlich wie bei der AP Bestimmung, eher untypisch und bislang nicht durch Literatur belegt. Dieses Ergebnis, das zwar in seinem Verlauf eine abnehmende Tendenz aufwies, legt hier zumindest den Verdacht nahe, dass BMP-7 einen osteoinduktiven Effekt auf FB, bzw. Sehnen besitzt. Nur so könnte man sich erklären, wieso von FB, bzw. Sehnen osteoblastenspezifische, bzw. knochenspezifische Produkte gebildet werden können, obwohl diese eigentlich nicht von FB oder Sehnen gebildet werden. Ob dieser Einfluss von BMP-7 auf molekularer-genetischer Ebene funktioniert oder ob es gar zu einer gewissen Transformation der FB zu Osteoblasten-like cells gekommen ist, konnte durch diese Studie nicht eruiert werden und bedarf in Folgestudien molekular-genetischer Tests.

5.2.2. Vergleich der Analytergebnisse aus der Zellyse der einzelnen Gruppen

Ähnlich wie die Ergebnisse aus den MÜ zeigten auch hier die Gruppen mit BMP-7 Applikation, im Gegensatz zu den Gruppen ohne BMP-7, eine deutlich höhere AP-Aktivität. Dabei zeigte Gruppe 1 in der Tendenz über 3 Monate zwar einen abnehmenden Verlauf, jedoch war die AP-Aktivität im Gegensatz zur Gruppe 2 deutlich erhöht. Ähnliches zeigte auch Gruppe 3, wobei hier eine zunehmende Aktivität über 3 Monate zu beobachten war. Wie Gruppe 1 zeigte auch diese Gruppe eine deutlich höhere Aktivität als Gruppe 4.

Auch dieses Ergebnis war wieder überraschend und leider nicht mit anderen Studien zu vergleichen. Es zeigt aber wieder den möglicherweise bestehenden osteoinduktiven Effekt

von BMP-7 nicht nur auf OB, sondern eben auch auf FB bzw. Sehnen. Wie dieser zu Stande kommt, ist dabei durch die Ergebnisse und Methoden dieser Arbeit nicht zu ermitteln und bedarf weiterer Test in Folgestudien.

5.2.3. Vergleich der Analytergebnisse aus den MÜ und der Zelllyse

Vergleicht man die Ergebnisse der Analyte aus den MÜ und der Zell-Lyse wird der positive Effekt einer BMP-7 Applikation deutlich. Insbesondere die AP-Bestimmung zeigt die Unterschiede auf. Zwar stiegen die AP Ergebnisse aus den MÜ nicht kontinuierlich an, sie lagen aber während der gesamten Versuchslaufzeit höher als die der Gruppen ohne BMP-7. Die schwankenden Aktivitätsniveaus der Gruppen mit einer BMP-7 Applikation könnten auf durch die oben beschriebenen hemmenden Mechanismen zurückzuführen sein und werden im späteren Verlauf noch näher erläutert. Auch in den Ergebnissen der Zell-Lyse weisen die Werte der Gruppen mit einer BMP-7 Applikation auf diesen positiven Effekt hin. Insbesondere auch hier ist besonders, dass auch in der Gruppe 3 (Sehne+BMP-7) AP Anstiege zu beobachten waren, während in der Gruppe 4 (Sehne) diese nicht vorkamen.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse aus den MÜ und der Zell-Lyse die gleiche Tendenz erkennen, nämlich den positiven Effekt von BMP-7 auf die Gruppen mit einer Applikation und überraschender Weise auch auf die Gruppe, wo dies gar nicht vermutet wurde, nämlich auf die Gruppe 3 (Sehne+BMP-7).

5.2.4. Vergleich der Färbeergebnisse der einzelnen Gruppen

Die Ergebnisse der histologischen Färbungen lassen ebenfalls, wie die klinisch-chemischen Analysen, einen positiven Effekt erkennen, die durch verstärkte Zonen mit EZM, Osteoid-Ansammlungen und kalkähnliche Ablagerungen dargestellt werden konnten.

Die EZM setzt sich allgemein aus verschiedenen Komponenten zusammen, die grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen besteht sie aus Grundsubstanz und zum anderen aus Fasern. Vorherrschend bei der Gruppe der Fasern sind die Kollagene, des Weiteren befinden sich in der EZM auch Glykosaminoglykane und Proteoglykane. Welche Kollagen-Typen in der EZM der Sehnen aus diesem Versuch vorhanden sind ist nicht untersucht worden. Allein der Zuwachs der EZM über den Verlauf konnte durch die Histologie beschrieben werden.

So zeigten die Gruppen, die eine BMP-7 Applikation erhalten haben (Gruppe 1 und 3), eine Zunahme der EZM und der Osteoid- und Mineralisierungszonen über den Verlauf von 3

Monaten. Während die Gruppen ohne BMP-7 (Gruppe 2 und 4) einen langsameren Aufbau der EZM und verzögerte Mineralisierungsprozesse aufzeigten. Innerhalb dieser Gruppen war noch zu erkennen, dass die Gruppe 4 (Sehne ohne OB und ohne BMP-7) eine verzögertere EZM-Bildung im Vergleich zur Gruppe 2 (Sehne+OB ohne BMP-7) aufwies.

Die Gruppen 1 und 3 waren, was die Bildung der EZM anbelangte, mitunter gleich schnell im Aufbau. Die Osteoidablagerungen und Mineralisierungszonen waren jedoch in der Gruppe 1 am stärksten ausgeprägt und insbesondere im 3. Monat besonders eindrucksvoll zu beobachten (siehe hierzu Abb. 46). Im Vergleich dazu waren in der Gruppe 3 über 2 Monate kalkähnliche Einschlüsse in der EZM festzustellen (Monat 1 und Monat 2), während in der Gruppe 1 diese kalkähnlichen Einschlüsse nur einmal zum Ende der Versuchszeit vorkamen (Monat 3). Stellt man die Färbeergebnisse, abhängig von ihrer EZM-Bildungszeit und Stärke, verglichen mit dem Anteil an Osteoidablagerungen und Mineralisierungszonen zueinander dar, so ergibt sich folgendes Bild:

Gruppe 1	>	Gruppe 3	>	Gruppe 2	>	Gruppe 4
Sehne+ OB +BMP-7		Sehne+BMP-7		Sehne+OB		Sehne allein

Überraschend hierbei ist wiederum der Fakt, dass die Gruppe 3, bezogen auf die vorher beschriebenen Kriterien, die zweitstärkste Gruppe ist. Dadurch wird deutlich, dass ein positiver osteoinduktiver und mitunter proliferativer BMP-7 Effekt auf Sehnen bzw. Fibroblasten möglich wäre.

Leider können diese Ergebnisse nicht mit anderen Studien verglichen werden, da in diesen Studien entweder Zellkulturen histologisch gefärbt worden sind oder Präparate erstellt wurden, die einen in vivo bezogenen Knochen-Sehnen-Interface-Ausschnitt darstellen.

In den Studien, die das alleinige Einwachsverhalten von Transplantaten in den Bohrkanal untersucht haben, ohne Wachstumsfaktoren, wurde gezeigt, dass, ausgehend von den Knochen, Strukturen aussprossen, sog. Sharpey-Fasern, die in das Transplantat einwachsen und somit die Festigkeit und Einheilung des Transplantats im Bohrkanal bewirken^{(16),(36)}.

Mihelic et al zeigte in seiner Arbeit, dass die Knochenbildung und der Wiederaufbau um den Bohrkanal durch die BMP-7 Gabe signifikant gesteigert werden konnte⁽⁵⁷⁾. Zusätzlich wurde hier gezeigt, dass sich entlang des Bohrkanals, zwischen der Sehne und dem Knochen, eine Zellschicht aus faserförmigem Gewebe gebildet hatte und an der Knochenseite Osteoidablagerungen und OB anzutreffen waren. Auch diese Effekte waren in den Gruppen, die mit BMP-7 versorgt wurden deutlich ausgeprägter. Kang et al zeigte in seiner Studie sowohl in

histologischen Präparaten, als auch in Färbungen der Zellkulturen, den positiven Effekt von BMP-7 auf die Knochenneubildung in vitro⁽³⁷⁾. Seine gewonnenen Ergebnisse korrelieren in diesem Zusammenhang mit denen von uns gesehenen Beobachtungen.

Ähnliche Resultate, bei Färbungen der Zellkulturen, wurden auch in der Studie von Shen et al gezeigt⁽⁷⁹⁾.

Diese lassen aber leider keine direkten Übertragungen auf unsere Ergebnisse zu, sondern ermöglichen höchstens einen Vergleich von Beobachtungen oder eine Annäherung an vergleichbare Effekte.

5.2.5. Vergleich der Färbeergebnisse in Bezug auf die Analytergebnisse

Ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen der klinisch-chemischen Bestimmung und der histologischen Auswertungen lässt sich nicht anstellen. Leider war es aus logistischen Gründen nicht möglich, histologische Präparate in Abständen von einer Woche zu erstellen. Daher sind die histologischen Präparate in den monatlichen Abständen vom 1. bis 3. Monat schlecht mit den wöchentlich gewonnenen Analytergebnissen zu vergleichen.

Jedoch ist eine Tendenz zu erkennen, die den positiven, osteoinduktiven und proliferativen Effekt einer BMP-7 Gabe sowohl bei der klinisch-chemischen Analytbestimmung als auch bei der histologischen Auswertung unterstreicht.

5.2.6. Vergleich der REM-Ergebnisse der einzelnen Gruppen

Da schon in den histologischen Präparaten Unterschiede in Bezug auf die EZM-Bildung, die Osteoid-Ablagerung, den Mineralisierungsprozess der verschiedenen Gruppen zu erkennen waren, sind diese auch auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen.

Die Auswertung der Bilder zeigte, dass die EZM-Bildung in den Gruppen mit BMP-7 ausgeprägter und schneller verlief als in den Gruppen ohne BMP-7. Dabei zeigten sich bei diesen Gruppen über einen viel längeren Zeitraum an der Sehnenoberfläche noch die typischen Kollagenfibrillen, während die Sehnen der Gruppen mit BMP-7 zu diesem Zeitpunkt (2. Monat) schon fast komplett und später, um den 3. Monat, vollständig mit EZM umgeben waren.

Auch die Auswertung der REM-Bilder, bezüglich auf andere vergleichbare Studien, ist ähnlich wie die der histologischen Präparate sehr schwierig, da es hierzu keine relevante Literatur gibt. Trotz der schwierigen Vergleichbarkeit und der Quantifizierung der BMP-7

Effekte geben die REM-Bilder doch einen fantastischen Einblick in die Ultrastruktur einer Sehne nach Langezeitkultur in vitro.

5.3. Diskussion der Ergebnisse des Zusatzversuches

Dieser Versuch sollte zeigen, wie sich die in diesem Versuchsaufbau beteiligten Zellen ohne den Einfluss einer Sehne in vitro verhalten. Um einen besseren Effekt und bessere Darstellbarkeit in Bezug auf die Zunahme der AP- und LDH-Aktivität innerhalb dieser Gruppen zu erzielen, erfolgte die erstmalige BMP-7 Applikation nach einer Laufzeit von 12 Tagen. Bis zu diesem Zeitpunkt variierten die Ergebnisse aus Zell-Lyse und MÜ innerhalb der Gruppen nur unwesentlich. Wesentliche Unterschiede waren erst nach der ersten BMP-7 Gabe zu beobachten.

5.3.1. Vergleich der Analytergebnisse aus der Zelllyse der einzelnen Gruppen

Ausgehend vom Tag der ersten BMP-7 Applikation (12. Tag) stieg die AP-Aktivität der Gruppen 1 (OB+BMP-7) und 5 (OB+FB im Verhältnis 80:20 + BMP-7) stark an. Die AP-Aktivität der Gruppe 3 (FB+BMP-7) blieb zu diesem Zeitpunkt noch unverändert gering, da theoretisch FB auch keine AP produzieren. Trotz dieser Ausnahme in den Gruppen mit einer BMP-7 Applikation ist zu diesem Zeitpunkt aber der Unterschied zwischen den Gruppen mit BMP-7 und denen ohne BMP-7 sehr deutlich und zeigt die positive Wirkung von BMP-7 auf die AP-Aktivität und indirekt damit auch auf die OB.

Interessant ist, dass die Aktivität der Gruppe 5 über den gesamten Verlauf, ab der BMP-7 Gabe, stets niedriger war; was hier natürlich die Frage aufwirft, ob dies an den 20 % FB Anteil lag, der dieser Gruppe hinzugefügt worden war, und ob in diesem Zusammenhang von den FB mitunter ein hemmender Faktor ausging, der die Proliferation und Aktivität der OB störte und gegebenenfalls verzögerte. Diese Vermutung legen Ergebnisse einer Studie von Wang et al nahe, der nachweisen konnte, dass durch die Interaktion von OB und FB die Zellaktivität und Produktivität von OB reduziert wurde, im Vergleich zu Kulturen ohne FB⁽⁹⁰⁾.

Die AP-Aktivität der Gruppen 1 und 5 sank, nach einer einzigen Spitze um den 16. Tag, kontinuierlich bis zum Ende des Versuchs ab. Dieses Phänomen könnte zum einen durch die hemmenden Mechanismen, die eine BMP-7 Applikation auslöst, zu erklären sein. Was aber in diesem Versuch zusätzlich beobachtet werden konnte, war, dass insbesondere der in den

Gruppen 1 und 5 nach einer BMP-7 Applikation gebildete Zellrasen sich um den 16. bis 20. Tag zusammenrollte und in der lichtmikroskopischen Beurteilung wenige bis sehr wenige vitale Zellen zu erkennen waren. Im weiteren Verlauf regenerierten sich die Zellen wieder, dass heißt aus den zusammengerollten Zellrasen sprossen wieder vitale Zellen aus. Erklärt werden könnten diese Beobachtungen mit den Ergebnissen einer Studie von Gautschi et al, der von ähnlichen Ergebnissen berichtete. Dort wurde gezeigt, dass rhBMP-7 eine signifikante, höhere Apoptoserate in humanen OB verursachte und dies in einem zeitlichen und dosisabhängigen Maße und ungeachtet der Anwesenheit von GF im Serum⁽²⁴⁾.

Diese Ergebnisse widersprechen in großem Maße den vorher beschriebenen proliferativen und differenzierenden Eigenschaften von BMP-7, insbesondere auch den Ergebnissen aus dem Hauptversuch, müssen aber in Bezug auf diese Ergebnisse in Betracht gezogen werden, unter dem Vorbehalt, dass BMP-7 neben den positiven Effekten auch negative Effekte attestiert werden müssen.

5.3.2. Vergleich der Analytergebnisse aus den MÜ der einzelnen Gruppen

Auch hier stieg, ausgehend vom Tag der ersten BMP-7 Applikation (12. Tag), die AP-Aktivität der Gruppen, die eine BMP-7-Applikation erhalten hatten, an. Dabei stieg die AP-Aktivität der Gruppen 3 (FB+BMP-7) und 5 (OB+FB im Verhältnis 80:20 + BMP-7) ab der ersten BMP-7 Gabe an und, um eine Woche versetzt, die AP-Aktivität der Gruppe 1 (OB+BMP-7) stark an. Die AP-Aktivität der Gruppe 1 war im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen die BMP-7 erhielten, im Verlauf am stärksten ausgeprägt und um den 20. Tag am höchsten. Die AP-Aktivität der Gruppe 3 stieg ausgehend vom 12. Tag sukzessive bis zum 20. Tag an. Beide Gruppen wiesen dann ab dem 20. Tag eine AP-Aktivität Abnahme auf. Die AP-Aktivität der Gruppe 5 zeigte einen über den gesamten Zeitraum wellenförmigen Verlauf. Die Gruppen ohne BMP-7 wiesen eine mitunter konstant niedrige AP-Aktivität auf, die sich nur minimal veränderte.

Diese Unterschiede zeigen auch hier einen positiven Einfluss von BMP-7 auf die AP-Aktivität in den MÜ. Interessant ist hier in diesem Zusammenhang auch wieder der positive Effekt einer BMP-7 Applikation auf die Gruppe 3, da, wie schon vorher erwähnt, eine AP Produktion von FB nicht erwartet wurde und bezüglich eines Einflusses von BMP-7 auf FB hier wenige Studien stattgefunden haben. Yamada et al konnte diesbezüglich einen positiven Effekt von BMP-7 bei bovinen Sehnenzellen aufzeigen, allerdings zeigte sich dieser Einfluss in einem Anstieg des Matrix Metabolismus und nicht in einem Anstieg der AP-Aktivität⁽⁹⁹⁾.

Die LDH-Bestimmung ist, wie im Hauptversuch, eher als Zellaktivitätsmarker zu betrachten. Ausgehend von der ersten BMP-7 Applikation am 12. Tag, stieg hier in allen Gruppen, die BMP-7 erhielten, die LDH-Aktivität an. Mitunter korrelierten diese Werte auch mit der AP-Aktivität. So war z.B. die LDH-Aktivität um den 20. Tag in der Gruppe 1, ebenso wie die AP-Aktivität, am höchsten. Von allen Gruppen mit BMP-7 zeigte aber Gruppe 3 (FB+BMP-7) die größte Aktivitätszunahme. Hier war die höchste Aktivität schon um den 16. Tag zu erkennen. Leider korrelierten diese Ergebnisse nicht mit der AP-Aktivität der Gruppe 3, diese scheinen vorversetzt zu sein. Ein Grund dafür könnte sein, dass das BMP-7 ggf. einen Transformationsprozess in Gang gesetzt hatte, der in einer höheren Zellaktivität (LDH-Anstieg) erkennbar war und dafür sorgte, dass die FB, ebenfalls wie OB, zu einer AP-Produktion befähigt waren, zu erkennen an dem zeitversetzten AP-Anstieg. Um dies jedoch eindeutig zu bestätigen, wären weitere Untersuchungen von Nöten.

Wie bei der AP-Aktivität sanken auch hier die LDH-Werte aller Gruppen mit BMP-7 nach Erreichen ihrer Maxima wieder ab. Die Gruppen ohne BMP-7 zeigten auch schon wie bei der AP-Aktivität eine niedrige LDH-Aktivität, die sich nur geringfügig veränderte.

Auch diese Ergebnisse würden einen positiven Einfluss einer BMP-7 Applikation bekräftigen. Insbesondere ist hier der Einfluss von BMP-7 auf die FB interessant, da diese Gruppe sogar die höchste Aktivitätszunahme aufwies. Eine Erklärung dafür könnten, wie schon oben angedeutet, die ggf. stattgefundenen Transformationsprozesse sein, die durch BMP-7 ausgelöst wurden und die FB dazu befähigten ein anderes, für FB untypisches, Protein-Muster (AP) zu produzieren. Da aber keine genaueren Analysen diesbezüglich vorliegen, kann dies nur vermutet und als Erklärung herangezogen werden.

Die Lactat-Bestimmung wies in allen Gruppen einen, in der Tendenz, zunehmenden Verlauf auf und lag im gesamten Versuchszeitraum bei einem Mittel um ca. 10-11 mmol/l. Dabei stiegen die Lactat-Werte der Gruppen mit BMP-7 viel früher an, während die Lactat-Werte der Gruppen ohne BMP-7 erst zum Versuchsende anstiegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der MW im Abstand von zwei Tagen richtig gewählt war und die Zellkulturen nicht in ein azidotisches Milieu abrutschten. Die zu tolerierende Lactatkonzentration in dieser Zellkultur wurde vorher mittels eines MTT-Tests ermittelt und auf < 20 mmol/l festgelegt. Werte > 20 mmol/l bremsen die Proliferation der Zellkultur und lassen zudem vermehrt Zellen absterben. In der gesamten Versuchszeit stiegen aber in keiner Gruppe die Lactat Werte > 14mmol/l.

5.3.3. Vergleich der Analytergebnisse aus der Zelllyse und den MÜ

Vergleicht man die Ergebnisse der Analyte aus den MÜ und der Zelllyse, wird ein positiver Effekt einer BMP-7 Applikation deutlich. Insbesondere die AP-Bestimmung zeigt diese Unterschiede auf. Zwar sanken die AP Ergebnisse aus MÜ und Zelllyse nach kurzer Zeit wieder ab, lagen aber dennoch über einen langen Zeitraum deutlich über der AP-Aktivität von Gruppen ohne BMP-7 Applikation.

5.4. Positive Effekte einer BMP-7 Applikation

Ein wichtiger Punkt in diesem Versuch war es zu klären, inwieweit die Knochen-Sehnen-Interaktion auf das Einwachsen des Knochens in die Sehne beschränkt ist, bzw. ob es beobachtbare Effekte gibt, die eine osteoinduktive Potenz einer Sehne (bzw. der FB) erkennen oder vermuten lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Sehnen eine proliferative Eigenschaft besitzen. Die aus den Sehnen auswachsenden Zellen sind stoffwechselaktiv, was die Ergebnisse der Analytbestimmungen aus dem Haupt- und Nebenversuch auch erkennen lassen. Zudem kam es zu einem gewissen Synergismus zwischen OB und aus der Sehne auswachsenden FB, die mitunter einen Einfluss auf die Aktivität der OB hatten. Dieser Effekt lässt sich gut in den Ergebnissen des Zusatzversuches in der Gruppe 5 und 6 (OB+FB) erkennen, wo die Aktivitätsniveaus der AP dieser beiden Gruppen immer niedriger sind als in den Gruppen, wo nur OB vorhanden sind (Gruppe 1 und 2). Diese Ergebnisse sind denen von Wang et al ähnlich, der aufzeigen konnte, dass im Zusammenspiel von OB und FB in der Knochen-Sehnen-Interaktion, die FB einen hemmenden Einfluss auf OB besitzen⁽⁹⁰⁾.

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse des Haupt- und Zusatzversuches aber auch eine osteoinduktive Potenz der Sehnen, die eine BMP-7-Applikation erhalten haben. Insbesondere die histologischen Auswertungen zeigten in diesem Zusammenhang starke Osteoidablagerungen an Sehnen, die über 3 Monate mit BMP-7 behandelt wurden. Aber auch die klinisch-chemischen Analysen von AP aus den Zelllysen und den MÜ bestätigten diese Ergebnisse. Leider gibt es hierzu keine eindeutig bestätigende Literatur und bislang sind nur von Yamada et al ähnliche Ergebnisse erzielt worden⁽⁹⁹⁾.

Den nächsten wichtigen Punkt, den es bei dieser Arbeit zu klären gab, war, ob sich die beschriebenen Wachstumsprozesse durch die Gabe von BMP-7 beschleunigen lassen und

somit dem BMP-7 positive proliferative und osteoinduktive Effekte oder Potenzen zugeschrieben werden können.

In allen mit BMP-7 behandelten Gruppen des Haupt- und Zusatzversuchs konnten schon gewisse positive Effekte nachgewiesen werden. Im Hauptversuch waren die Aktivitätsniveaus dieser beiden Parameter in den Gruppen mit BMP-7 stets höher, ebenso wie in den Gruppen des Zusatzversuchs. Ebenso zeigten sich histologisch Unterschiede zwischen den Gruppen die BMP-7 erhielten und solchen, die keines bekamen. Zwar sind die Ergebnisse nicht genau zu quantifizieren und eher deskriptiv, dennoch sind die Effekte die durch BMP-7 hervorgerufen wurden, in Form von Osteoidablagerungen, Mineralisierungsprozessen und verstärkter EZM-Bildung der Sehnen zuerkennen und in den Gruppen ohne BMP-7 geringer und verspätet zu beobachten.

Auch in der Auswertung der REM-Bilder waren die Unterschiede der Sehnengruppen mit und ohne einer BMP-7 Gabe zu erkennen. Hier zeigten sich Unterschiede in der Homogenität und der Wachstumsgeschwindigkeit der EZM.

Zusammenfassend sind hier die positiven Effekte von BMP-7 auf die Proliferation und die osteoinduktive Potenz mitunter sehr gut zu erkennen und vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien. Wie z.B. mit den Ergebnissen von Mihelic et al, der einen positiven Effekt von BMP-7 bei der Sehnen-Integration in der VKB-Rekonstruktion nachweisen konnte⁽⁵⁷⁾. Oder auch den Studien von Lavery et al, Tou et al, Knutsen et al und Kang et al, die einen positiven Einfluss von BMP-7 auf molekularer Ebene nachweisen konnten^{(37),(41),(47),(86)}.

5.5. Mögliche negative und hemmende Effekte einer BMP-7 Applikation

Neben den bekannten positiven, oben beschriebenen Effekten war noch ein anderer wichtiger Punkt bei dieser Arbeit zu klären, nämlich ob BMP-7 neben den osteoinduktiven und proliferativen Eigenschaften vielleicht auch hemmende Faktoren besitzt, die in einer Langzeitkultur Einfluss auf das Zellwachstum nehmen können. Diese Frage war in diesem Zusammenhang umso interessanter, da ja sowohl im Haupt- als auch im Zusatzversuch mitunter doch starke Schwankungen in den Aktivitätsniveaus der AP und der LDH zu beobachten waren. Diese Aktivitätsschwankungen könnten mitunter mehrere Ursachen haben. BMP löst nach der Bindung an seine Rezeptoren mehrere hemmende Signalkaskaden aus. Diese sogenannten negativen Rückkopplungsschleifen, bestehend aus verschiedenen Proteingruppen, regulieren auf natürliche Weise die Aktivitätszustände der durch BMP-7 aktivierten Zellen und verhindern so eine überschießende Proliferation, Differenzierung und Stoffwechselaktivität. Zu diesen Proteingruppen gehören u.a. I-Smads⁽⁶⁸⁾, Smurf⁽¹⁰⁶⁾, Tob⁽¹⁰⁴⁾, Cdk6^{(12),(65)}. Neben diesen Rückkopplungsschleifen gibt es zahlreiche Antagonisten, die direkt über eine Bindung an BMP selbst oder auch indirekt, über die Inaktivierung von BMP Rezeptoren, die Übertragung der BMP Signalkaskade unterbinden. Ebenso wie durch die negativen Rückkopplungsschleifen soll durch die Antagonisten eine überschießende Aktivität der vorher aktivierten Zellen verhindert werden. Zu den bekanntesten Antagonisten zählen u.a. Noggin, Chordin und der Bambi-Pseudorezeptor^{(25),(27)}.

Diese beiden Mechanismen, die physiologischer Weise nach einer BMP-7 Applikation erfolgen, können u.a. als Erklärungsversuch für die Schwankungen der Aktivitätsniveaus herangezogen werden. Leider können sie in dieser Arbeit jedoch nur vermutet werden, da quantitative Nachweise von Antagonisten und Bestandteile der negativen Rückkopplung in dieser Arbeit nicht erfolgten. Die bislang bekannten Studienergebnisse bezüglich dieser Problematik legen aber den Verdacht nahe, dass es sich bei den in dieser Arbeit beobachteten Schwankungen um solche handelt, die durch Antagonisten oder Bestandteile der negativen Rückkopplung hervorgerufen sein könnten.

Des weiteren ist durch Gautschi et al bekannt, dass durch BMP-7 eine dosisabhängige Apoptose Auslösung möglich ist⁽²⁴⁾. Dies könnte als Erklärung für die beobachteten Effekte im Zusatzversuch herangezogen werden. Dort waren nach der erstmaligen BMP-7 Applikation in einigen Zellkulturen der Gruppen 1, 3 und 5 Zelluntergänge beobachtet worden, dergestalt, dass sich die gebildeten Zellrasen zusammenrollten und im Lichtmikroskop nur noch vereinzelte vitale Zellen zu erkennen waren. Jedoch entwuchsen

diesen zusammengerollten Zellrasen mit der Zeit wieder neue Zellen, so dass hier nicht von einem 100% igem Zelltod auszugehen war. Auch hier erfolgten leider keine weiteren klärenden Untersuchungen, wie z.B. Tunel-Färbungen, da diese Beobachtungen nicht erwartet wurden und quasi als Nebenbeobachtung auffielen.

Zusammenfassend sind hier hemmende oder negative Effekte auf die Proliferation und die Stoffwechselaktivität durch eine BMP-7 Gabe zu vermuten. Da diese nicht durch quantitative Nachweise bestätigt worden sind, können diese Effekte nur deskriptiv dargestellt und müssen durch weitere Untersuchungen exakter quantifiziert werden. Ob diese Effekte sich letztendlich negativ auf die gesamte Versuchslaufzeit oder auf die Wirkung der Knochen-Sehnen-Interaktion auswirken können, muss dabei aber ebenfalls noch geklärt werden. Jedoch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse legen diesen Schluss nicht Nahe.

5.6. Mögliche Störeffekte mit Einfluss auf das Kulturwachstum

Beim vierten zu beantwortenden Punkt dieser Arbeit war es zu klären, ob im Zusammenhang mit den beobachteten Prozessen weitere störende Faktoren existieren, die erstens nicht durch BMP-7 induziert worden sind und zweitens mitunter vielleicht die Interaktion zwischen den OB und FB oder generell das Wachstum verlangsamen oder gar verhindern. Hier könnten die klinisch-chemischen Ergebnisse des Zusatzversuches und die Ergebnisse der AP-Zelllyse des Zusatzversuches einen möglichen hemmenden Einfluss der FB auf die OB-Aktivität aufzeigen. In der AP-Zelllyse ist ein Unterschied in der AP-Aktivität sowohl in den Gruppen mit BMP-7 (Gruppe 1 u. 2) als auch in den Gruppen ohne BMP-7 (Gruppe 5 u. 6) zu erkennen. Die Graphen dieser Gruppen weisen dabei einen sehr ähnlichen Verlauf auf, jedoch mit dem Unterschied, dass die AP-Aktivitätsniveaus der Gruppen 5 u. 6 immer unterhalb der AP-Aktivitätsniveaus der Gruppen 1 und 2 liegen. Dies könnte die Vermutung nahe legen, dass die 20% FB Anteile in diesen Gruppen 5 und 6 einen hemmenden Einfluss auf die OB-Aktivität ausüben könnten. Auch die klinisch-chemischen Analysen von AP und LDH zeigen ähnliche Ergebnisse. Ebenso wie bei der AP-Zelllyse, lagen die Aktivitätsniveaus der Gruppen mit Mischpopulationen stets unter den Gruppen mit Reinpopulationen. Lichtmikroskopisch wiesen dabei die Gruppen 5 und 6 eine hohe Zelldichte auf und gaben keinerlei Hinweise auf eine erhöhte Zellmortalität oder Apoptoserate.

Diese Ergebnisse korrelieren dann auch mit anderen Studien. Wang et al zeigte 2007 in seiner Studie den hemmenden Einfluss auf die Wachstumsrate und Stoffwechselaktivität von FB in einer FB:OB-Mischkultur⁽⁹⁰⁾. Zusammenfassend ist diese Erkenntnis sehr interessant und

bedarf durch diese Arbeitsgruppe noch näherer Untersuchungen, um wirklich sicher sagen zu können, dass der in dieser Arbeit beobachtete hemmende Einfluss von FB ausging und eine weitere Ursache für die aufgetretenen Schwankungen darstellen könnte.

Ein weiterer Ansatz zur Klärung dieser Schwankungen in den Aktivitätsniveaus wäre die Tatsache, dass OB selbst Substanzen produzieren, die einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation und die Stoffwechselaktivität aufweisen. In der Literatur ist ein solcher von OB produzierter Faktor beschrieben: der sog. FGF23. Dieser Wachstumsfaktor spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Vit D- und Phosphat-Stoffwechsels und der Knochen-Mineralisation⁽²³⁾. Zum einen wurde nachgewiesen, dass eine verstärkte Expression von FGF23 die OB Differenzierung und die Matrix Mineralisation in vitro unterdrücken kann, wie Wang et al 2008 gezeigt hat⁽⁸⁹⁾. Zum zweiten wurde aber auch der starke Zusammenhang von Vit D₃ und FGF23 aufgezeigt. Tang et al wies 2010 nach, dass die FGF23 Expression in OB durch Vit D₃ mitunter stark angeregt wurde⁽⁸⁵⁾.

Da alle Versuchsgruppen des Haupt- und Zusatzversuchs mit Vit D₃ substituiertes Medium zur Versorgung erhielten, ist diese Erkenntnis natürlich ein weiterer Diskussionspunkt. In der Literatur wird dabei der Effekt von Vit D₃ mitunter kontrovers diskutiert. Artaza et al zeigte 2009, dass Vit D die Expressionsrate von Kollagen und profibrotischen Faktoren vermindert⁽²⁾, während Zhou et al 2006 Vit D als einen idealen Substitutionspartner für die osteogene Induktion postulierte⁽¹⁰⁹⁾. Und Zhou et al konnte 2010 einen positiven Effekt von Vit D auf die OB Differenzierung aufweisen⁽¹⁰⁸⁾.

Um diese Aussagen auf die Ergebnisse dieser Studie übertragen oder nachweisen zu können, bedarf es noch näherer quantitativer Analysen, z.B. von FGF23 oder den Nachweis von evtl. hemmenden Einflüssen von Vit D₃ auf die in dieser Arbeit benutzten Zellpopulationen. Daher können diese Beobachtungen bis dahin nur theoretisch als Erklärungsversuch herangezogen werden.

6. Mögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die VKB-Chirurgie und Schlussfolgerungen

Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen und bestätigen den schon bekannten proliferativen und osteoinduktiven Charakter einer BMP-7 Applikation. Nach unserem Kenntnisstand erfolgte in dieser Studie erstmalig eine Langzeitkultur einer Sehne in vitro und auch eine histologische Auswertung allein von Sehnen, so dass hier insbesondere aufgezeigt

werden konnte, welche Veränderungen durch BMP-7 an einer Sehne stattfinden können. In anderen Studien wurden dagegen histologische Präparate aus den Bereichen der Bohrkanäle und der Übergangszonen der Knochen-Sehnen-Interaktionen erstellt. In den histologischen Präparaten dieser Arbeit wurde dabei gezeigt, dass das BMP-7 nicht nur Einfluss auf Sehnen in einer OB-Kultur nimmt, sondern genauso einen positiven Einfluss auf Sehnen allein ausübt, zu erkennen an der verstärkten EZM und vermehrten Osteoidablagerungen. Diese Beobachtungen könnten die Vermutung nahe legen, dass der Einfluss von BMP-7 in der Interaktion von Knochen und Sehnen im Bohrkanal wahrscheinlich viel größer und umfangreicher ist, als bislang vermutet. Zudem werfen die Ergebnisse dieser Studie die Frage auf, ob das Einwachsen des Transplantats in den Bohrkanal nicht nur ein vom Knochen ausgehender Prozess ist, sondern vielmehr ein Zusammenspiel von Knochen (OB) und Sehne (FB) auf interzellulärer Ebene. In diesem Zusammenhang ist sicher auch der von uns beobachtete mögliche hemmende Einfluss von FB auf OB interessant und vielleicht Anlass für weitere Untersuchungen in diese Richtung.

Was letztendlich die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf die VKB-Chirurgie anbelangt, lässt sich zusammenfassend sagen, dass BMP-7 einen positiven Nutzen aufweist und zwar dergestalt, dass:

1. durch eine BMP-7 Gabe die Stoffwechselleistungen der beteiligten Zellmaterialien (Knochen/OB und Sehnen/FB) verstärkt werden,
2. durch eine BMP-7 Gabe die sog. Verknöcherungsprozesse, d.h. die Bildung von Mineralisierungs- und Osteoidzonen, verstärkt und beschleunigt auftreten,
3. ein möglicher hemmender Einfluss von FB bei der Interaktion mit OB durch eine BMP-7 Gabe, reduziert werden könnte.

All diese dargelegten Aspekte legen den Schluss nahe, dass eine Applikation von BMP-7 bei einer VKB-Plastik unter Verwendung eines Sehnentransplantates, einen positiven Effekt auf das Einwachsverhalten des Transplantats in den Bohrkanal nehmen und dabei in der Lage sein kann, das Einwachsverhalten zu beschleunigen, die ossäre Integration des Transplantats im Bohrkanal zu stärken und damit ein Transplantatversagen und die Regenerations- und Ausfallzeit der Patienten, wie die damit verbunden Patientenkosten, zu verringern.

7. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, mittels zweier Versuche, den Effekt von BMP-7 auf Sehnen, OB und FB zu untersuchen und dabei folgende Kernfragen zu klären:

1. Wie verläuft das Einwachsenverhalten bezüglich der Knochen-Sehnen-Interaktion?
2. Gibt es in diesem Zusammenhang störende Faktoren bei der Interaktion von OB und FB?
3. Können diese Prozesse durch die Gabe von BMP-7 beschleunigt werden?
4. Bestehen neben den proliferativen Eigenschaften von BMP-7 auch hemmende Faktoren?

Durchgeführt wurden ein Hauptversuch (Laufzeit 10 Wo), der den BMP-7 Einfluss auf Sehnen und ein Zusatzversuch (Laufzeit 24 d), der den BMP-7 Einfluss auf OB und FB untersuchen sollte. Alle Zellkulturen erhielten BGJ-Medium und einen MW/48h, bei dem jeweils Vit D₃/MW und entsprechend Gruppenzugehörigkeit 400ng/ml BMP-7/MW appliziert wurden. In beiden Versuchen erfolgten die Bestimmung von AP, LDH und Lactat aus den MÜ sowie die Bestimmung der AP aus der Zelllyse. Im Hauptversuch erfolgte zudem die Bestimmung von OCN und die Anfertigung von histologischen und REM-Bildern.

In beiden Versuchen konnten positive Effekte einer BMP-7 Gabe durch eine Zunahme der AP- und LDH-Aktivität und Zunahme des OCN-Gehaltes gezeigt werden. Histologisch zeigten sich verstärkte und beschleunigte Osteoid- und Mineralisierungszonen sowie vermehrte EZM-Bildung. Bei der REM zeigten die Sehnen eine verstärkte EZM-Bildung und Homogenität gegenüber solchen Sehnen, die kein BMP-7 bekamen. Zudem zeigte sich, dass durch BMP-7 auch bei Sehnen und FB deren Aktivitätsniveaus von AP und LDH steigen.

Beide Versuche lassen einen positiven Effekt einer BMP-7 Gabe erkennen. Da auch bei den Sehnen und FB ein positiver Effekt durch BMP-7 zu beobachten war, ist, was das Einwachsenverhalten anbelangt, ein Zusammenspiel von OB und FB wahrscheinlich. Ebenso zeigen die Ergebnisse eine mögliche Wechselwirkung zwischen OB und FB, die sich mitunter negativ auf Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechselaktivität der OB auswirken, aber wiederum durch eine gleichzeitige BMP-7 Gabe minimiert werden können. Da bislang die Studienlage bezüglich in-vitro-Sehnen-Langzeitkulturen sehr rar ist und in diesem Zusammenhang auch ein positiver Effekt von BMP-7 auf Sehnen und FB selten beobachtet wurde, ist es schwierig, die gewonnen Erkenntnisse mit anderen Studien zu vergleichen und bedarf weiterer Studien.

8. Ausblick

Um die gewonnenen Ergebnisse besser interpretieren zu können, insbesondere was den hemmenden Einfluss der FB auf die OB und den positiven Einfluss von BMP-7 auf die FB und Sehnen angeht, sind neue Studien erforderlich. In diesen sollten dann, ausgehend von unseren Beobachtungen, größere Gruppenkollektive kultiviert und untersucht werden.

Um dabei auch einen besseren Überblick über Stoffwechselaktivität der Zellkulturen zu bekommen, sollten kürzere Abstände in der Bestimmung klinisch-chemischer Analyte gewählt werden, z.B. die Analyt-Bestimmung bei jedem MW (alle 48 h). Zusätzlich sollten neue Parameter hinzugezogen werden, um die von uns beobachteten Ergebnisse besser interpretieren zu können, wie z.B. die Bestimmung von BMP-Antagonisten (Noggin etc.) oder die gezielte Ausschaltung negativer Mechanismen, um insbesondere hemmende Effekte besser zu lokalisieren. Des Weiteren wäre die Nutzung anderer Techniken, wie der Einsatz von PCR zum Nachweis von Transskripten, empfehlenswert, insbesondere von denen, die als Analyte hohe Zerfallsraten aufweisen (z.B. OCN), um besser die genetische Aktivität der Zellen darstellen zu können.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse ist eine intensivere Untersuchung der BMP-7 Effekte auf die Sehnen bzw. FB sinnvoll. Hierbei ist vielleicht der Schwerpunkt auf die Veränderungen der Zelloberfläche und des genetischen Profils zu setzen, d.h. Veränderungen in der Präsentation und Dichte von Rezeptormolekülen und der Transskripte, die einen Hinweis geben könnten, dass sich die FB in Richtung einer OB-ähnlichen Zellpopulation entwickeln. Zuletzt sollte versucht werden, vielleicht durch kleinere Sehnenstücke oder mehrere Stücke einer Sehne eine bessere Quantifizierung der histologischen und rasterelektronenmikroskopischen Bilder zu ermöglichen.

Abschließend bleibt zu sagen, dass die BMP-7 Forschungen im Bereiche der Kreuzbandchirurgie noch viel an Potential in sich bergen. Jede weitere Studie aus diesem Forschungsbereich, wird mit Sicherheit ein weiterer Baustein sein, die Erkenntnislage zu erhellen, so dass es nicht mehr allzu lange dauern kann, bis BMP-7 in der Kreuzbandchirurgie erfolgreich zum Einsatz kommen wird.

Es bleibt letztendlich zu hoffen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit hierzu einen kleinen Beitrag leisten konnten.

9. Abstract

Background

Injuries of the knee are very often and most of the halves of the knee injuries (46%) are injuries of the anterior cruciate ligament (ACL). In this context, the tendon-bone healing plays a special role and is of particular interest. Aim of this study was to evaluate the effects of BMP-7 on tendon-bone healing respective interaction. For this purpose, a study carried out in vitro, consisting of a pre-and a main test.

Methods

Conducted a major trial (term 10 weeks) were of the BMP-7 effect on tendon and an additional experiment (term 24 d), which was to investigate the influence of BMP-7 on OB and FB. All cell cultures were BGJ medium and medium exchange (ME)/48h, were applied in the corresponding group membership and each Vit D3/ME 400ng/ml BMP-7/ME. In both experiments was determined by AP, LDH and Lactate of the frozen medium as well as the determination of the AP from the cell lysis. In the main experiment also was determined by OCN and the preparation of histological and SEM images.

Results

In both tests we could see a positive effect of a BMP-7 application. This shows the biochemical, histological and electron microscopically results. The AP increases in major and pre-test showed sometimes highly significant values, with p-values <0.00001 . Similar results were also found in the regulations LDH and OCN ($p < 0.001$). Histology showed enhanced and accelerated osteoid and mineralized zones, and increased extracellular matrix formation. SEM showed the tendon in an enhanced ECM formation and homogeneity to such tendons that received no BMP-7. In addition, it was found that BMP-7 also in tendon and FB whose activity levels of AP and LDH increase. Also we showed in this study that there is an influence in the activity of osteoblasts and fibroblasts.

Conclusions

Both tests can be a positive effect of BMP-7 recognize gift. Because even with the tendons and FB, a positive effect of BMP-7 was observed, is, in terms of growing-in the act, a combination of OB and FB probably. Similarly, the results indicate a possible interaction between OB and FB that affect sometimes negative impact on growth rate and metabolic

activity of the OB, but again can be minimized by simultaneous BMP-7 administration. As previously, the study location with respect is very thin in vitro tendon long-term cultures and in this context, a positive effect of BMP-7 was rarely observed on tendons and FB, it is difficult to compare the obtained findings with other studies and need for further studies, but lets see the positive effect of BMP-7 application and so should his place in the ACL surgery necessarily manifest.

Keywords: BMP-7, Osteoblast (OB), Fibroblast (FB), Tendon, Tendon-bone-healing, ACL

10. Abkürzungsverzeichnis

AP/ALP	Alkalische Phosphatase
b-FGF	basic Fibroblast Growth Factor/FGF-2
BG	Bindegewebe
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cbf α 1	core binding factor α 1
EZM	extrazelluläre Matrix
FB	Fibroblasten
FGF-23	Fibroblast Growth Factor-23
Gc	Granulozyten
KM	Knochenmark
Mph	Makrophagen
MW	Medienwechsel
MÜ	Mediumüberstand
OB	Osteoblasten
OC	Osteoclasten
OCN	Osteocalcin
OZ	Osteozyten
POB	Prä-Osteoblasten
PS	Patellarsehne
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
STS	Semitendinosussehne
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VKB	vorderes Kreuzband
ZL	Zelllyse

11. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: klinische relevante Knieverletzungen (Tortendiagramm) S.9
- Abb.2: Bandverletzungen des Kniebandapparates (Tortendiagramm) S.9
- Abb.3: Ätiologie des VKB-Risses (Tortendiagramm) S.9
- Abb.4: Anatomie des Kniegelenkes und des Kreuzbandes, S.11
- Abb.5: Kraft-Dehnungsdiagramm eines Kniebandes, S.12
- Abb.6: STS-Transplantat mit Fäden armiert (intraoperativ), S.14
- Abb.7: Bohrkanal Verlauf eines VKB-Transplantates, S.14
- Abb.8: intraartikuläre Sicht der Arbeitsschritte während einer VKB-Plastik, S.15
- Abb.9: Darstellung der unterschiedlichen Smad-Proteine, S.22
- Abb.10: Smad-Signaltransduktion, S.22
- Abb.11: Inhibierung der Smad-Signaltransduktion, S.23
- Abb.12: Regulation der intrazellulären BMP-Signalkaskade, S.26
- Abb.13: 3-dimensionales Modell von Noggin, S.27
- Abb.14: Darstellung der BMP-7 Bindungsstelle im Noggin-Molekül, S.27
- Abb.15: schematische Zeichnung und Stereoview von BMP-7, S.29
- Abb.16: BMP-7 und BMP-Rezeptoren Bindungsmöglichkeiten, S.30
- Abb.17: Differenzierung von pluripotenten Vorläuferzellen durch GF, S.31
- Abb.18: Differenzierung von OB durch GF aktivierte Signalkaskaden, S.31
- Abb.19: schematischer Ablauf der Bildung einer Knochenmatrix, S.32
- Abb.20: Aufbau und Ablauf des Hauptversuches, S.42
- Abb.21: Aufbau und Ablauf des Zusatzversuches, S.43
- Abb.22: Präparations-Abläufe von bovinen Sehnen, S.46
- Abb.23: Fixierung von Sehnen und Versorgung mit BGJ-Medium, S.48
- Abb.24: Färbanleitung für v.Kossa und PAS-Alcianblau Färbungen, S.54
- Abb.25: AP-Bestimmung der Gruppen 1 u. 2 über 10 Wochen, S.59
- Abb.26: AP-Bestimmung der Gruppen 3 u. 4 über 10 Wochen, S.60
- Abb.27: AP-Bestimmung der Gruppen 1 u. 3 über 10 Wochen, S.61
- Abb.28: Lactat-Bestimmung der Gruppen 1-4 über 10 Wochen, S.62
- Abb.29: LDH-Bestimmung der Gruppen 1-4 über 10 Wochen, S.64
- Abb.30: OCN-Bestimmung der Gruppen 1 und 2 über 10 Wochen, S.66
- Abb.31: OCN-Bestimmung der Gruppen 3 und 4 über 10 Wochen, S.67
- Abb.32: OCN-Bestimmung der Gruppen 1 und 3 über 10 Wochen, S.68
- Abb.33: AP-Bestimmung aus der Zell-Lyse der Gruppen 1-4, S.70

- Abb.34: AP-Bestimmung der Gruppen 1-6 aus MÜ über 24 Tage, S.72
- Abb.35: AP-Bestimmung der Gruppen 1,3 und 5 aus MÜ über 24 Tage, S.74
- Abb.36: Lactat-Bestimmung der Gruppen 1-6 aus MÜ über 24 Tage, S.75
- Abb.37: LDH-Bestimmung der Gruppen 1-6 aus MÜ über 24 Tage, S.77
- Abb.38: AP-Bestimmung der Zell-Lyse der Gruppen 1-6 über 24 Tage, S.79
- Abb.39a u. b: AP-Bestimmung der Gruppen mit und ohne BMP-7 der Zell-Lyse, S.80 u. 81
- Abb.40: Sehnen-Färbungen Gruppe 1-4 nach dem 1. Monat, S.82
- Abb.41: Sehnen-Färbungen Gruppe 1-4 nach dem 2. Monat, S.83
- Abb.42: Sehnen-Färbungen Gruppe 1-4 nach dem 3. Monat, S.84
- Abb.43: Sehnen-Färbungen der Gruppe 1 nach dem 1., 2. und 3. Monat, S.85
- Abb.44: Sehnen-Färbungen der Gruppe 1 nach dem 1. Monat, S.85
- Abb.45: Sehnen-Färbungen der Gruppe 1 nach dem 2. Monat, S.86
- Abb.46: Sehnen-Färbungen der Gruppe 1 nach dem 3. Monat, S.87
- Abb.47: Sehnen-Färbungen der Gruppe 2 nach dem 1., 2. und 3. Monat, S.88
- Abb.48: Sehnen-Färbungen der Gruppe 2 nach dem 1. Monat, S.88
- Abb.49: Sehnen-Färbungen der Gruppe 2 nach dem 2. Monat, S.89
- Abb.50: Sehnen-Färbungen der Gruppe 2 nach dem 3. Monat, S.90
- Abb.51: Sehnen-Färbungen der Gruppe 3 nach dem 1., 2. und 3. Monat, S.91
- Abb.52: Sehnen-Färbungen der Gruppe 3 nach dem 1. Monat, S.91
- Abb.53: Sehnen-Färbungen der Gruppe 3 nach dem 2. Monat, S.92
- Abb.54: Sehnen-Färbungen der Gruppe 3 nach dem 3. Monat, S.93
- Abb.55: Sehnen-Färbungen der Gruppe 4 nach dem 1., 2. und 3. Monat, S.94
- Abb.56: Sehnen-Färbungen der Gruppe 4 nach dem 1. Monat, S.94
- Abb.57: Sehnen-Färbungen der Gruppe 4 nach dem 2. Monat, S.95
- Abb.58: Sehnen-Färbungen der Gruppe 4 nach dem 3. Monat, S.96
- Abb.59: REM-Bilder der Gruppe 2 und 4 nach 4 Wochen, S.97
- Abb.60: REM-Bilder der Gruppe 1 und 3 nach 4 Wochen, S.98
- Abb.61: REM-Bilder der Gruppe 2 und 4 nach 8 Wochen, S.98
- Abb.62: REM-Bilder der Gruppe 1 und 3 nach 8 Wochen, S.99
- Abb.63: REM-Bilder der Gruppe 1 und 2 nach 11 Wochen, S.100
- Abb.64: REM-Bilder der Gruppe 1 nach 11 Wochen, S.100
- Abb.65: Zellkultur-Bilder der Gruppe 1 und 2 nach 8 Tagen, S.101
- Abb.66: Zellkultur-Bilder der Gruppe 1 und 5 nach 16 Tagen, S. 101
- Abb.67: Zellkultur-Bilder der Gruppe 1 und 5 nach 20 Tagen, S. 102

12. Literaturverzeichnis

1. **Alaoui-Ismaili, M., and D. Falb.** 2009. Design of second generation therapeutic recombinant bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**:501-507.
2. **Artaza, J., and K. Norris.** 2009. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol* **200**:207-221.
3. **Bayreuth, O. C.** Rehabilitation nach vorderer Kreuzbandplastik mit Semitendinosus-/Gracilis-Sehne, p. 4, http://www.oc-bayreuth.de/pdf/reha_kreuzbandplastik.pdf.
4. **Bollen, S.** 2000. Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage. *Br J Sports Med* **34**:227-228.
5. **Cao, X., and D. Chen.** 2005. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* **357**:1-8.
6. **Carson, E. W., E. M. Anisko, C. Restrepo, R. A. Panariello, S. J. O'Brien, and R. F. Warren.** 2004. Revision anterior cruciate ligament reconstruction: etiology of failures and clinical results. *J Knee Surg* **17**:127-132.
7. **Chen, C.** 2009. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* **1**:21.
8. **Chen, D., M. Zhao, and G. Mundy.** 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**:233-241.
9. **Cook, S.** 1999. Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites. *Orthopedics* **22**:669-671.
10. **Cook, S., and D. Rueger.** 1996. Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*:29-38.
11. **Daniel, D. M., M. L. Stone, B. E. Dobson, D. C. Fithian, D. J. Rossman, and K. R. Kaufman.** 1994. Fate of the ACL-injured patient. A prospective outcome study. *Am J Sports Med* **22**:632-644.
12. **Derynck, R., and Y. Zhang.** 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**:577-584.
13. **Ducy, P., T. Schinke, and G. Karsenty.** 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**:1501-1504.
14. **Duquin, T. R., W. M. Wind, M. S. Fineberg, R. J. Smolinski, and C. M. Buyea.** 2009. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. *J Knee Surg* **22**:7-12.

15. **Ebisawa, T., M. Fukuchi, G. Murakami, T. Chiba, K. Tanaka, T. Imamura, and K. Miyazono.** 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* **276**:12477-12480.
16. **Ekdahl, M., J. Wang, M. Ronga, and F. Fu.** 2008. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **16**:935-947.
17. **Etienne, L.** 2003. Eine in-vitro-Studie über die Zugkräfte im vorderen Kreuzband und vorderen Kreuzband-Ersatz (Ligamentum Patellae- und Semitendinosus-Plastik), p. 15, http://edoc.ub.uni-muenchen.de/930/1/Luciani_Etienne.pdf.
18. **Fagelman, M., and K. B. Freedman.** 2005. Revision reconstruction of the anterior cruciate ligament: evaluation and management. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* **34**:319-328.
19. **Finsterbush, A., U. Frankl, Y. Matan, and G. Mann.** 1990. Secondary damage to the knee after isolated injury of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* **18**:475-479.
20. **Fithian, D., E. Paxton, M. Stone, W. Luetzow, R. Csintalan, D. Phelan, and D. Daniel.** 2005. Prospective trial of a treatment algorithm for the management of the anterior cruciate ligament-injured knee. *Am J Sports Med* **33**:335-346.
21. **Friedlaender, G.** 2001. OP-1 clinical studies. *J Bone Joint Surg Am* **83-A Suppl 1**:S160-161.
22. **Friedlaender, G., C. Perry, J. Cole, S. Cook, G. Cierny, G. Muschler, G. Zych, J. Calhoun, A. LaForte, and S. Yin.** 2001. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* **83-A Suppl 1**:S151-158.
23. **Fukumoto, S., and T. Martin.** 2009. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* **20**:230-236.
24. **Gautschi, O., D. Cadosch, R. Zellweger, K. Joesbury, and L. Filgueira.** 2009. Apoptosis induction and reduced proliferation in human osteoblasts by rhBMP-2, -4 and -7. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **9**:53-60.
25. **Gazzerro, E., and E. Canalis.** 2006. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* **7**:51-65.
26. **Gazzerro, E., V. Deregowski, S. Vaira, and E. Canalis.** 2005. Overexpression of twisted gastrulation inhibits bone morphogenetic protein action and prevents osteoblast cell differentiation in vitro. *Endocrinology* **146**:3875-3882.

27. **Gazzerro, E., V. Gangji, and E. Canalis.** 1998. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* **102**:2106-2114.
28. **Gothner, M. B.** 2006. Der Einfluss der Ruptur des vorderen Kreuzbandes auf die RHCL. Universität Ulm.
29. **Griffin, L.Y., Agel, J., Albohm, M.J., Arendt, E.A., Dick, R.W., Garrett, W.E.** 2000. Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies., p. 141–150, vol. 8, *J Am Acad Orthop Surg*.
30. **Griffith, D., P. Keck, T. Sampath, D. Rueger, and W. Carlson.** 1996. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:878-883.
31. **Groppe, J., J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A. Economides, W. Kwiatkowski, M. Affolter, W. Vale, J. Belmonte, and S. Choe.** 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420**:636-642.
32. **Ito, Y., and K. Miyazono.** 2003. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* **13**:43-47.
33. **Itoh, F., H. Asao, K. Sugamura, C. Heldin, P. ten Dijke, and S. Itoh.** 2001. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J* **20**:4132-4142.
34. **Jin, Y., E. Jeon, Q. Li, Y. Lee, J. Choi, W. Kim, K. Lee, and S. Bae.** 2004. Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *J Biol Chem* **279**:29409-29417.
35. **Kalajic, I., A. Staal, W. Yang, Y. Wu, S. Johnson, J. Feyen, W. Krueger, P. Maye, F. Yu, Y. Zhao, L. Kuo, R. Gupta, L. Achenie, H. Wang, D. Shin, and D. Rowe.** 2005. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* **280**:24618-24626.
36. **Kanazawa, T., T. Soejima, H. Murakami, T. Inoue, M. Katouda, and K. Nagata.** 2006. An immunohistological study of the integration at the bone-tendon interface after reconstruction of the anterior cruciate ligament in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* **88**:682-687.

37. **Kang, Y., W. Liao, Z. Yuan, P. Sheng, L. Zhang, X. Yuan, and L. Lei.** 2007. In vitro and in vivo induction of bone formation based on adeno-associated virus-mediated BMP-7 gene therapy using human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin* **28**:839-849.
38. **Katagiri, T., and N. Takahashi.** 2002. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* **8**:147-159.
39. **Kim, B., H. Lee, S. Park, S. Lee, T. Karpova, J. McNally, A. Felici, D. Lee, and S. Kim.** 2004. Jab1/CSN5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation. *Mol Cell Biol* **24**:2251-2262.
40. **Klinik für UHWC, U. M.** Verletzungen des vorderen Kreuzbandes, p. 5, http://www.traumacentrum.de/file/krankheitsbilder/Verletzungen_des_vorderen_Kreuzbandes.pdf.
41. **Knutsen, R., J. Wergedal, T. Sampath, D. Baylink, and S. Mohan.** 1993. Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **194**:1352-1358.
42. **Kohn, S. R. u. D.** 2002. Vorderes Kreuzband im Mittelpunkt des Interesses, p. 701, vol. 31.
43. **Kohno, T., Y. Ishibashi, E. Tsuda, T. Kusumi, M. Tanaka, and S. Toh.** 2007. Immunohistochemical demonstration of growth factors at the tendon-bone interface in anterior cruciate ligament reconstruction using a rabbit model. *J Orthop Sci* **12**:67-73.
44. **Koinuma, D., M. Shinozaki, A. Komuro, K. Goto, M. Saitoh, A. Hanyu, M. Ebina, T. Nukiwa, K. Miyazawa, T. Imamura, and K. Miyazono.** 2003. Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J* **22**:6458-6470.
45. **Kwong, F., S. Richardson, and C. Evans.** 2008. Chordin knockdown enhances the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* **10**:R65.
46. **Lam, M. H., D. T. Fong, P. S. h. Yung, E. P. Ho, W. Y. Chan, and K. M. Chan.** 2009. Knee stability assessment on anterior cruciate ligament injury: Clinical and biomechanical approaches. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* **1**:20.
47. **Lavery, K., S. Hawley, P. Swain, R. Rooney, D. Falb, and M. Alaoui-Ismaili.** 2009. New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *Bone* **45**:27-41.

48. **Lim, J.K., Hui, J., Li, L., Thambyah, A., Goh, J., Lee, E.H.** 2004. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 20(9):899-910.
49. **Linko, E., A. Harilainen, A. Malmivaara, and S. Seitsalo.** 2005. Surgical versus conservative interventions for anterior cruciate ligament ruptures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001356.
50. **Liu, F., F. Ventura, J. Doody, and J. Massagué.** 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15:3479-3486.
51. **Liu, S., V. Panossian, R. al-Shaikh, E. Tomin, E. Shepherd, G. Finerman, and J. Lane.** 1997. Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing. *Clin Orthop Relat Res*:253-260.
52. **Lucas, G. L.** 1999. A primer of biomechanics, Springer Verlag.
53. **Luu, H., W. Song, X. Luo, D. Manning, J. Luo, Z. Deng, K. Sharff, A. Montag, R. Haydon, and T. He.** 2007. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 25:665-677.
54. **Macías-Silva, M., P. Hoodless, S. Tang, M. Buchwald, and J. Wrana.** 1998. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* 273:25628-25636.
55. **Marsell, R., and T. Einhorn.** 2009. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 40 Suppl 3:S4-7.
56. **Massagué, J., and Y. Chen.** 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14:627-644.
57. **Mihelic, R., M. Pecina, M. Jelic, S. Zoricic, V. Kusec, P. Simic, D. Bobinac, B. Lah, D. Legovic, and S. Vukicevic.** 2004. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) promotes tendon graft integration in anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med* 32:1619-1625.
58. **Miyama, K., G. Yamada, T. Yamamoto, C. Takagi, K. Miyado, M. Sakai, N. Ueno, and H. Shibuya.** 1999. A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol* 208:123-133.
59. **Miyazono, K., Y. Kamiya, and M. Morikawa.** 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147:35-51.

60. **Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura.** 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**:251-263.
61. **Miyazono, K., and K. Miyazawa.** 2002. Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* **2002**:pe40.
62. **Miyazono, K., P. ten Dijke, and C. Heldin.** 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* **75**:115-157.
63. **Moustakas, A., and C. Heldin.** 2002. From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **16**:1867-1871.
64. **Nicholl, J. P.** 1991. *Injuries in sport and exercise*, Sports Council; ISBN:1872158714.
65. **Ogasawara, T., H. Kawaguchi, S. Jinno, K. Hoshi, K. Itaka, T. Takato, K. Nakamura, and H. Okayama.** 2004. Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires Smad-mediated down-regulation of Cdk6. *Mol Cell Biol* **24**:6560-6568.
66. **Onichtchouk, D., Y. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Delius, J. Massagué, and C. Niehrs.** 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**:480-485.
67. **Orthopädiepraxis Geißler, S., Gleichmann.** Rehabilitation nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes, p. 7, http://www.orthopaedie-bs.de/praxis/pdfs_nachbehandlung/Kreuzband.pdf.
68. **Pereira, R., A. Economides, and E. Canalis.** 2000. Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology* **141**:4558-4563.
69. **Petryk, A., O. Shimmi, X. Jia, A. Carlson, L. Tervonen, M. Jarcho, M. O'connor, and R. Gopalakrishnan.** 2005. Twisted gastrulation and chordin inhibit differentiation and mineralization in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Bone* **36**:617-626.
70. **Raju, G., N. Dimova, P. Klein, and H. Huang.** 2003. SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *J Biol Chem* **278**:428-437.
71. **Reinhardt, O.** Sportverletzungen des vorderen Kreuzbandes, p. 7, http://www.ganeo.de/facharbeiten/Olga_ReinhardtDiplomarbeit_Korrektur1312_1.pdf.

72. **Reuben, J. D., J. S. Rovick, R. J. Schrager, P. S. Walker, and A. L. Boland.** 1989. Three-dimensional dynamic motion analysis of the anterior cruciate ligament deficient knee joint. *Am J Sports Med* **17**:463-471.
73. **Rosenzweig, B., T. Imamura, T. Okadome, G. Cox, H. Yamashita, P. ten Dijke, C. Heldin, and K. Miyazono.** 1995. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7632-7636.
74. **Ross, M.H., Pawlina, W.** *Histology a Text and Atlas*, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins
75. **Sakou, T.** 1998. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* **22**:591-603.
76. **Salmon, L., V. Russell, T. Musgrove, L. Pinczewski, and K. Refshauge.** 2005. Incidence and risk factors for graft rupture and contralateral rupture after anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* **21**:948-957.
77. **Sampath, T., J. Maliakal, P. Hauschka, W. Jones, H. Sasak, R. Tucker, K. White, J. Coughlin, M. Tucker, and R. Pang.** 1992. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* **267**:20352-20362.
78. **Scranton, P.E. Jr., Lanzer, W.L., Ferguson, M.S., Kirkman, T.R., Pflaster, D.S.** 1998. Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. *Arthroscopy* **14**(7):702-16.
79. **Shen, B., A. Wei, S. Whittaker, L. Williams, H. Tao, D. Ma, and A. Diwan.** 2010. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem* **109**:406-416.
80. **Shen, Z., T. Nakamoto, K. Tsuji, A. Nifuji, K. Miyazono, T. Komori, H. Hirai, and M. Noda.** 2002. Negative regulation of bone morphogenetic protein/Smad signaling by Cas-interacting zinc finger protein in osteoblasts. *J Biol Chem* **277**:29840-29846.
81. **Sowa, H., H. Kaji, G. Hendy, L. Canaff, T. Komori, T. Sugimoto, and K. Chihara.** 2004. Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. *J Biol Chem* **279**:40267-40275.

82. **Spindler, K., T. Warren, J. J. Callison, M. Secic, S. Fleisch, and R. Wright.** 2005. Clinical outcome at a minimum of five years after reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* **87**:1673-1679.
83. **Statistisches Bundesamt, Z. B., Krankheitskostenrechnung:.** Krankheitskosten 2002 für die Diagnose M23 (Binnenschädigung des Kniegelenkes) in der Einrichtung Krankenhaus nach Geschlecht und Alter.
84. **Sutherland, M., J. Geoghegan, C. Yu, E. Turcott, J. Skonier, D. Winkler, and J. Latham.** 2004. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* **35**:828-835.
85. **Tang, W., L. Wang, X. Xu, Y. Zhou, W. Jin, H. Wang, and J. Gao.** 2010. Autocrine/paracrine action of vitamin D on FGF23 expression in cultured rat osteoblasts. *Calcif Tissue Int* **86**:404-410.
86. **Tou, L., N. Quibria, and J. Alexander.** 2003. Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Mol Cell Endocrinol* **205**:121-129.
87. **Unfallchirurgie:, L. d. D. G. f.** 5/2008. Vordere Kreuzbandruptur.
88. **Urist, M.** 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**:893-899.
89. **Wang, H., Y. Yoshiko, R. Yamamoto, T. Minamizaki, K. Kozai, K. Tanne, J. Aubin, and N. Maeda.** 2008. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res* **23**:939-948.
90. **Wang, I., J. Shan, R. Choi, S. Oh, C. Kepler, F. Chen, and H. Lu.** 2007. Role of osteoblast-fibroblast interactions in the formation of the ligament-to-bone interface. *J Orthop Res* **25**:1609-1620.
91. **Wilcke, A.** 2004. Vordere Kreuzbandläsion, p. 47, Verlag Birkhäuser.
92. **Wilcke, A.** 2004. Vordere Kreuzbandläsion, p. 37, Verlag Birkhäuser.
93. **Wilcke, A.** 2004. Vorderer Kreuzbandläsion, p. 48-49, Verlag Birkhäuser.
94. **Wilcke, A.** 2004. Vordere Kreuzbandläsion, p. 54 f, Verlag Birkhäuser.
95. **Winkler, D., M. Sutherland, J. Geoghegan, C. Yu, T. Hayes, J. Skonier, D. Shpektor, M. Jonas, B. Kovacevich, K. Staehling-Hampton, M. Appleby, M. Brunkow, and J. Latham.** 2003. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* **22**:6267-6276.

96. **Winkler, D., C. Yu, J. Geoghegan, E. Ojala, J. Skonier, D. Shpektor, M. Sutherland, and J. Latham.** 2004. Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem* **279**:36293-36298.
97. **Wittenberg, R. H., H. U. Oxfort, and C. Plafki.** 1998. A comparison of conservative and delayed surgical treatment of anterior cruciate ligament ruptures. A matched pair analysis. *Int Orthop* **22**:145-148.
98. **Wozney, J., V. Rosen, A. Celeste, L. Mitsock, M. Whitters, R. Kriz, R. Hewick, and E. Wang.** 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**:1528-1534.
99. **Yamada, M., K. Akeda, K. Asanuma, E. Thonar, H. An, A. Uchida, and K. Masuda.** 2008. Effect of osteogenic protein-1 on the matrix metabolism of bovine tendon cells. *J Orthop Res* **26**:42-48.
100. **Yamashita, H., P. ten Dijke, D. Huylebroeck, T. Sampath, M. Andries, J. Smith, C. Heldin, and K. Miyazono.** 1995. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* **130**:217-226.
101. **Yamazaki, S., K. Yasuda, F. Tomita, H. Tohyama, and A. Minami.** 2005. The effect of transforming growth factor-beta1 on intraosseous healing of flexor tendon autograft replacement of anterior cruciate ligament in dogs. *Arthroscopy* **21**:1034-1041.
102. **Yang, M., Q. Ma, G. Dang, K. Ma, P. Chen, and C. Zhou.** 2005. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-7 gene transfer induces C2C12 cell differentiation into osteoblast lineage cells. *Acta Pharmacol Sin* **26**:963-968.
103. **Yokota, Y., and S. Mori.** 2002. Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* **190**:21-28.
104. **Yoshida, Y., S. Tanaka, H. Umemori, O. Minowa, M. Usui, N. Ikematsu, E. Hosoda, T. Imamura, J. Kuno, T. Yamashita, K. Miyazono, M. Noda, T. Noda, and T. Yamamoto.** 2000. Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* **103**:1085-1097.
105. **Zhang, L., A. Jin, and Q. Li.** 2008. [Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **28**:1869-1873.

106. **Zhao, M., M. Qiao, S. Harris, B. Oyajobi, G. Mundy, and D. Chen.** 2004. Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **279**:12854-12859.
107. **Zhao, M., M. Qiao, B. Oyajobi, G. Mundy, and D. Chen.** 2003. E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **278**:27939-27944.
108. **Zhou, S., M. LeBoff, and J. Glowacki.** 2010. Vitamin D metabolism and action in human bone marrow stromal cells. *Endocrinology* **151**:14-22.
109. **Zhou, Y., Y. Liu, and J. Tan.** 2006. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin Med J (Engl)* **119**:1278-1286.
110. **Zhu, W., J. Kim, C. Cheng, B. Rawlins, O. Boachie-Adjei, R. Crystal, and C. Hidaka.** 2006. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. *Bone* **39**:61-71.
111. **Zhu, W., B. Rawlins, O. Boachie-Adjei, E. Myers, J. Arimizu, E. Choi, J. Lieberman, R. Crystal, and C. Hidaka.** 2004. Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* **19**:2021-2032.
112. **Zürich, G. d. K.** 2009. Ruptur des vorderen Kreuzbandes: operative oder konservative Behandlung?

13. Statistische Tabellen

Tab.3: Mittelwert und Standardabweichung der AP-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 1 und 2 sowie der Kontrollgruppen über 10 Wochen.

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 1	4,6	0,5	26	3,4	4,5	0,6	6,7	1,2	4,0	0,2	2,9	0,3	4,5	1,1	7,1	0,3	6,5	0,9	5,4	0,2
Gruppe 2	0,9	0,7	2,2	0,7	2,5	0,6	2,8	0,3	2,8	0,1	1,6	0,4	1,6	0,2	2,7	0,5	2,1	0,2	3	0,3
Ko. Gr.	0,5	0,7	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,7	1,3	0,3	0,2	0,3	1,4	0,6	1,7	0	1,5	0	1,7	0
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9								n=6								n=3			

Tab.4: Mittelwert und Standardabweichung der AP-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 3 und 4 sowie der Kontrollgruppe über 10 Wochen

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 3	2,8	0,5	5,8	0,6	7,3	0,9	8,6	0,9	4,8	0,3	4,7	0,8	4,4	0,5	8,4	0,6	8,8	0,6	7	0,5
Gruppe 4	1,1	0,4	2	0,2	1,9	0,4	2,9	0,4	3,4	0,3	1,4	0,3	1,9	0,2	2,9	0,3	2,6	0,2	2,8	0,5
Ko. Gr.	0,5	0,7	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,7	1,3	0,3	0,2	0,3	1,4	0,6	1,7	0	1,5	0	1,7	0
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9								n=6								n=3			

Tab.5: Mittelwert und Standardabweichung der AP-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 1 und 3 sowie der Kontrollgruppe über 10 Wochen

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 1	4,6	0,5	26	3,4	4,5	0,6	6,7	1,2	4,0	0,2	2,9	0,3	4,5	1,1	7,1	0,3	6,5	0,9	5,4	0,2
Gruppe 3	2,8	0,5	5,8	0,6	7,3	0,9	8,6	0,9	4,8	0,3	4,7	0,8	4,4	0,5	8,4	0,6	8,8	0,6	7	0,5
Ko. Gr.	0,5	0,7	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,7	1,3	0,3	0,2	0,3	1,4	0,6	1,7	0	1,5	0	1,7	0
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9								n=6								n=3			

Tab.6: Mittelwert und Standardabweichung der Lactat-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 1 bis 4 sowie der Kontrollgruppe über 10 Wochen

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 1	13	0,5	15	1,3	11	1,5	12	1,4	11	0,8	12	0,9	10	0,8	9,8	0,5	10	0,4	10	0,2
Gruppe 2	11	0,6	12	0,8	9,4	0,7	10	1,0	10	0,9	11	0,7	9,1	0,6	9,3	0,3	9,6	0,3	11	0,5
Gruppe 3	17	1,3	15	0,7	12	1,1	12	0,5	11	0,6	13	0,8	10	0,5	9,6	0,2	9	0,4	11	0,5
Gruppe 4	14	1,0	14	0,9	9,0	0,8	11	1,2	11	0,8	12	0,7	9,5	0,5	9,7	0,5	9,2	0,2	11	0,2
Ko. Gr.	6,0	0,5	5,7	0,5	5,1	0,5	5,2	0,1	7,1	2,9	6,3	0,1	6,5	0,5	6,1	0,3	7,3	0,7	7,1	0,4
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9								n=6								n=3			

Tab. 7: Mittelwert und Standardabweichung der LDH-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 1 bis 4 sowie der Kontrollgruppe über 10 Wochen

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 1	8,7	1,1	30	4,1	5,6	1,3	5,9	2,6	3,5	0,7	7,9	0,9	9,0	2,8	12	2,2	21	4,2	12	1,4
Gruppe 2	13	2,0	15	1,5	5,3	1,4	4,2	0,6	5,4	0,7	10	1,7	8,4	1,5	11	3,5	18	1,4	14	3,3
Gruppe 3	7	1,3	10	0,8	3,9	1,1	4,2	0,6	3,3	0,6	6,1	1,9	8,2	1,6	10	0,7	10	0,4	17	1,0
Gruppe 4	14	1,0	11	1,5	3,8	1,1	4,0	0,6	4,5	1,2	13	2,4	9,2	1,7	10	1,4	9,8	0,8	6,2	0,6
Ko. Gr.	14	0,8	1,6	1,2	2,5	0,5	2,2	0,7	2,0	0,7	4,0	0,8	6,6	2,4	6,9	0,4	24	1,1	12	0,9
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9								n=6								n=3			

Tab. 8: Mittelwert und Standardabweichung der Osteocalcin-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 1 und 2 sowie der Kontrollgruppe über 10 Wochen.

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 1	3,7	0,6	3,2	0,9	3,3	0,7	4,1	0,7	3,2	0,6	3,3	0,3	3,8	0,7	3,5	0,3	3,0	0,2	2,5	0,1
Gruppe 2	2,8	0,5	2,9	0,3	2,1	0,5	2,0	0,5	2,5	0,5	2,3	0,4	2,2	0,4	2,4	0,6	2,4	0,2	2,3	0,4
Ko. Gr.	1,2	0,6	1,4	0,4	1,3	0,3	1,5	0,5	1,7	0,2	1,4	0,7	1,5	0,4	1,8	0,3	1,9	0,3	1,0	0,6
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9									n=6						n=3				

Tab. 9: Mittelwert und Standardabweichung der Osteocalcin-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 3 und 4 sowie der Kontrollgruppe über 10 Wochen.

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 3	3,9	0,6	5,1	0,7	4,6	0,6	3,7	0,5	3,8	0,6	3,7	0,3	2,9	0,7	3,6	0,4	3,2	0,6	2,7	0,3
Gruppe 4	2,5	0,4	3,0	0,6	2,5	0,5	2,7	0,6	2,7	0,3	2,8	0,4	2,7	0,5	2,8	0,2	2,7	0,4	2,6	0,6
Ko. Gr.	1,2	0,6	1,4	0,4	1,3	0,3	1,5	0,5	1,7	0,2	1,4	0,7	1,5	0,4	1,8	0,3	1,9	0,3	1,0	0,6
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9									n=6						n=3				

Tab. 10: Mittelwert und Standardabweichung der Osteocalcin-Bestimmung des Hauptversuches der Gruppen 1 und 3 sowie der Kontrollgruppe über 10 Wochen.

	Wo 1		Wo 2		Wo 3		Wo 4		Wo 5		Wo 6		Wo 7		Wo 8		Wo 9		Wo 10	
Gruppe 1	3,7	0,6	3,2	0,9	3,3	0,7	4,1	0,7	3,2	0,6	3,3	0,3	3,8	0,7	3,5	0,3	3,0	0,2	2,5	0,1
Gruppe 3	3,9	0,6	5,1	0,7	4,6	0,6	3,7	0,5	3,8	0,6	3,7	0,3	2,9	0,7	3,6	0,4	3,2	0,6	2,7	0,3
Ko. Gr.	1,2	0,6	1,4	0,4	1,3	0,3	1,5	0,5	1,7	0,2	1,4	0,7	1,5	0,4	1,8	0,3	1,9	0,3	1,0	0,6
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=9									n=6						n=3				

Tab. 11: Mittelwert und Standardabweichung der AP-Bestimmung des Hauptversuches aus der Zell-Lyse der Gruppen 1 bis 4 über 10 Wochen.

	Monat 1		Monat 2		Monat 3	
Gruppe 1	21	1,4	16,6	0,4	11,4	0,4
Gruppe 2	2,5	0,42	1	0,1	1,5	0,8
Gruppe 3	22,5	0,5	39,2	3,9	43,2	18,9
Gruppe 4	1,9	0,5	1,3	0,4	0,55	0,3
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=2					

Tab. 12: Mittelwert und Standardabweichung der ALP-Bestimmung aus den Mediumüberständen des Zusatzversuches der Gruppen 1 bis 6 über 24 Tage.

	4. Tag		8. Tag		12. Tag		16. Tag		20. Tag		24. Tag	
Gruppe 1	12	1,2	13	2,5	5	2,4	5	2,5	54	2,0	23	1,4
Gruppe 2	13	1,2	14	2,6	12	2,7	10	1,3	10	1,0	14	1,2
Gruppe 3	11	1,1	11	0,8	6	2,8	11	0,6	25	1,9	17	1,4
Gruppe 4	12	1,3	12	2,7	7	1,0	11	0,9	10	2,4	0	1,8
Gruppe 5	14	0,5	8	2,4	6	2,3	14	2,3	9	2,0	14	1,4
Gruppe 6	13	1,3	15	2,1	9	1,3	10	0,5	11	0,8	17	0,9
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=36		n=30		n=24		n=18		n=12		n=6	

Tab. 13: Mittelwert und Standardabweichung der Lactat-Bestimmung aus den Mediumüberständen des Zusatzversuches der Gruppen 1 bis 6 über 24 Tage.

	4. Tag		8. Tag		12. Tag		16. Tag		20. Tag		24. Tag	
Gruppe 1	6	1,4	6	0,2	5	1,7	11	1,0	12	1,2	8	1,0
Gruppe 2	7	0,3	6	0,5	4	0,1	5	0,4	5	0,4	12	0,6
Gruppe 3	7	0,4	8	0,4	12	1,4	10	0,2	11	1,6	9	0,8
Gruppe 4	7	0,3	7	0,3	4	0,1	4	1,7	4	0,7	6	1,1
Gruppe 5	7	0,2	5	1,0	8	0,7	11	2,1	11	0,3	11	1,3
Gruppe 6	7	0,2	7	0,4	5	0,5	6	0,1	4	1,4	12	0,8
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=36		n=30		n=24		n=18		n=12		n=6	

Tab. 14: Mittelwert und Standardabweichung der LDH-Bestimmung aus den Mediumüberständen des Zusatzversuches der Gruppen 1 bis 6 über 24 Tage.

	4. Tag		8. Tag		12. Tag		16. Tag		20. Tag		24. Tag	
Gruppe 1	12	0,8	9	2,6	10	1,4	6	1,4	32	1,3	20	1,7
Gruppe 2	14	1,1	12	2,8	4	2,5	8	1,0	6	1,9	4	1,8
Gruppe 3	15	1,1	12	2,3	2	1,1	40	0,4	32	1,4	22	1,5
Gruppe 4	15	1,9	10	2,2	3	1,4	1	0,8	5	2,6	5	2,0
Gruppe 5	13	2,3	3	2,8	9	3,1	10	2,3	19	2,5	9	2,2
Gruppe 6	11	0,6	15	2,2	2	0,9	3	2,9	9	1,8	9	1,9
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=36		n=30		n=24		n=18		n=12		n=6	

Tab. 15: Mittelwert und Standardabweichung der AP-Bestimmung aus der Zelllyse des Zusatzversuches der Gruppen 1 bis 6 über 24 Tage.

	4. Tag		8. Tag		12. Tag		16. Tag		20. Tag		24. Tag	
Gruppe 1	13	1,0	13	2,1	17	2,1	126	2,7	95	2,3	53	2,5
Gruppe 2	14	2,6	13	1,9	20	2,2	29	2,8	44	2,4	67	2,9
Gruppe 3	0,6	0,3	0,7	0,3	0,6	0,2	0,8	0,4	1,7	0,5	24	1,4
Gruppe 4	0,5	0,1	0,7	0,3	0,6	0,2	0,7	0,1	0,4	0,2	0,7	0,2
Gruppe 5	9,9	1,9	9,3	2,3	12	1,7	47	2,2	23	2,6	3	0,6
Gruppe 6	10	0,6	11	1,7	11	2,2	17	1,5	28	1,5	47	2,3
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	n=36		n=30		n=24		n=18		n=12		n=6	

Tab.16: Überblick über statistische Auswertung

	Abb.	Gruppen	Zeitpunkte	Ausreißertests	Signifikanztests	
Tab.14	25-27	5	10	50	100	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.15	28	5	10	50	100	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.16	29	5	10	50	100	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.17	30l	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.18	30l	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.19	30l	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.20	30r	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.21	30r	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.22	30r	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.23	31l	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.24	31l	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.25	31l	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.26	31r	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.27	31r	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.28	31r	1	10	10	45	wochenweiser Vergleich/Enzym
Tab.29	32-34	5	10	50	100	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.30	35,36	4	3	12	18	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.31	37,38	6	6	36	90	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.32	39	6	6	36	90	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.33	40	6	6	36	90	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
Tab.34	41,42 r u. l	6	6	36	90	alle Gr. gegeneinander/Zeitpunkt
	Summen	60	187	476	1318	

Tab.17: p-Werte für die Abb. 25-27

Gruppe	1 vs. 2	1 vs. 3	1 vs. 4	1 vs. K	2 vs. 3	2 vs. 4	2 vs. K	3 vs. 4	3 vs. K	4 vs. K
Woche1	5,30E-10	5,26E-07	1,28E-11	1,15E-06	6,39E-06	2,07E-01	4,19E-01	4,88E-09	5,53E-06	7,62E-04
Woche2	1,32E-14	3,65E-13	2,55E-16	1,73E-06	1,05E-07	7,24E-01	1,75E-02	2,49E-09	4,09E-04	8,29E-05
Woche3	4,76E-06	1,47E-06	2,01E-09	8,97E-07	1,45E-09	4,05E-02	9,55E-03	8,25E-11	1,49E-04	5,61E-03
Woche4	1,85E-13	6,60E-06	1,01E-11	5,44E-08	3,71E-12	3,58E-01	7,79E-05	9,85E-12	2,75E-05	3,57E-04
Woche5	1,43E-07	3,65E-04	2,43E-02	3,27E-05	1,65E-07	2,90E-03	7,06E-05	2,16E-04	2,80E-04	6,05E-03
Woche6	6,70E-05	9,18E-04	2,88E-06	2,28E-04	1,88E-05	1,88E-01	1,89E-02	6,42E-06	5,79E-03	1,68E-02
Woche7	6,96E-09	2,04E-01	3,30E-08	1,87E-04	2,77E-06	2,36E-02	1,27E-01	2,08E-06	5,10E-03	7,10E-02
Woche8	1,74E-04	3,01E-02	8,89E-05	4,75E-03	2,30E-04	4,49E-01	1,99E-01	1,85E-04	1,19E-02	6,96E-02
Woche9	1,35E-03	2,30E-02	2,35E-03	4,36E-02	7,40E-05	3,25E-02	1,22E-01	1,10E-04	1,08E-02	4,85E-02
Woche10	4,13E-04	7,44E-03	1,70E-03	3,87E-03	3,37E-04	6,74E-01	6,95E-02	6,80E-04	1,20E-02	2,08E-01

Tab.18: p-Werte für die Abb. 28

Gruppe	1 vs. 2	1 vs. 3	1 vs. 4	1 vs. K	2 vs. 3	2 vs. 4	2 vs. K	3 vs. 4	3 vs. K	4 vs. K
Woche1	2,54E-06	7,09E-08	1,35E-02	1,98E-06	2,99E-10	9,62E-07	1,01E-04	1,49E-04	9,99E-06	6,78E-05
Woche2	2,80E-05	9,83E-01	1,94E-02	1,10E-04	4,75E-07	1,32E-03	5,26E-05	2,91E-03	1,55E-06	2,60E-05
Woche3	6,76E-03	3,50E-04	9,84E-04	8,68E-06	4,25E-06	2,73E-01	7,22E-04	2,70E-06	2,19E-04	3,35E-03
Woche4	3,52E-03	7,57E-01	2,95E-01	2,37E-03	2,10E-06	1,50E-02	1,27E-06	2,61E-01	4,92E-06	1,38E-03
Woche5	3,16E-02	4,78E-01	3,99E-01	6,61E-03	6,49E-02	1,63E-01	3,94E-02	7,73E-01	3,07E-03	1,82E-02
Woche6	8,87E-02	2,70E-01	4,24E-01	1,89E-03	6,88E-03	2,34E-01	1,38E-03	4,56E-02	5,91E-04	6,38E-04
Woche7	2,85E-01	6,67E-01	1,95E-01	1,19E-02	7,74E-02	7,78E-01	5,91E-03	4,19E-02	1,61E-03	5,38E-03
Woche8	1,74E-04	3,01E-02	8,89E-05	1,21E-01	2,30E-04	4,49E-01	2,34E-02	1,85E-04	8,81E-02	1,24E-02
Woche9	8,25E-02	1,69E-02	1,19E-02	2,37E-02	9,04E-02	9,96E-02	2,37E-02	4,19E-01	9,58E-02	1,45E-02
Woche10	8,69E-02	1,53E-02	2,13E-03	8,54E-03	2,97E-01	2,53E-01	3,06E-02	8,47E-01	1,98E-02	3,36E-03

Tab.19: p-Werte für die Abb. 29

Gruppe	1 vs. 2	1 vs. 3	1 vs. 4	1 vs. K	2 vs. 3	2 vs. 4	2 vs. K	3 vs. 4	3 vs. K	4 vs. K
Woche1	6,62E-05	1,41E-02	1,58E-06	2,87E-03	2,60E-06	5,73E-01	6,63E-01	8,23E-08	1,71E-03	7,67E-01
Woche2	2,69E-08	4,66E-10	1,55E-09	3,35E-04	1,14E-06	1,12E-04	3,70E-05	2,51E-01	6,93E-06	3,80E-04
Woche3	6,69E-01	1,01E-02	8,19E-03	6,14E-02	1,81E-02	1,38E-02	5,58E-02	5,00E-01	2,64E-01	6,06E-01
Woche4	4,04E-02	4,73E-02	6,58E-03	2,93E-02	8,89E-01	2,11E-01	2,21E-02	1,60E-01	1,71E-02	4,43E-02
Woche5	4,82E-04	2,36E-01	1,27E-01	1,33E-01	1,09E-05	9,69E-02	2,23E-03	3,06E-02	6,60E-02	1,34E-01
Woche6	2,08E-02	7,16E-02	5,98E-04	1,21E-02	3,78E-03	2,98E-02	2,16E-02	2,51E-04	3,53E-01	1,78E-02
Woche7	6,49E-01	5,76E-01	9,16E-01	4,69E-01	8,74E-01	4,36E-01	3,37E-01	3,62E-01	3,85E-01	2,29E-01
Woche8	9,38E-01	2,33E-01	3,85E-01	1,90E-01	4,46E-01	5,79E-01	3,48E-01	6,77E-01	7,31E-02	1,66E-01
Woche9	3,86E-01	1,17E-02	1,16E-02	5,94E-01	7,23E-04	9,68E-04	8,14E-02	7,74E-01	1,29E-03	4,57E-03
Woche10	4,78E-01	7,78E-03	2,52E-03	8,20E-01	1,64E-01	1,61E-02	6,43E-01	8,18E-05	4,20E-02	1,60E-02

Tab.20: p-Werte für die Abb. 30-32

Gruppe	1 vs. 2	1 vs. 3	1 vs. 4	1 vs. K	2 vs. 3	2 vs. 4	2 vs. K	3 vs. 4	3 vs. K	4 vs. K
Woche1	4,13E-02	4,82E-01	1,94E-04	8,00E-03	7,06E-03	2,89E-02	1,57E-02	1,59E-05	3,50E-03	9,41E-04
Woche2	5,98E-01	2,32E-04	2,88E-03	7,68E-02	1,73E-06	1,53E-05	1,14E-03	9,03E-09	1,49E-03	4,43E-02
Woche3	7,02E-03	1,09E-03	3,26E-02	2,86E-02	2,58E-07	3,00E-01	1,63E-04	1,21E-06	7,97E-04	2,82E-02
Woche4	5,50E-06	2,22E-01	1,20E-04	4,54E-03	2,05E-05	1,16E-02	1,77E-01	8,26E-04	3,69E-03	5,64E-03
Woche5	1,98E-02	1,40E-01	1,66E-01	2,51E-02	2,04E-03	1,87E-01	1,14E-03	1,30E-02	2,43E-02	1,64E-02
Woche6	5,34E-02	6,80E-03	3,09E-01	4,89E-03	6,83E-04	1,10E-02	4,43E-02	2,41E-02	6,86E-03	9,73E-04
Woche7	2,59E-03	3,58E-02	1,88E-02	1,86E-02	8,48E-02	1,51E-01	2,57E-02	6,88E-01	1,64E-02	1,51E-02
Woche8	7,01E-02	8,47E-01	1,10E-01	1,79E-02	7,50E-02	5,40E-01	1,68E-01	1,19E-01	3,39E-02	8,20E-02
Woche9	5,48E-02	6,29E-01	3,40E-01	2,05E-02	1,14E-01	3,84E-01	3,41E-02	3,00E-01	8,20E-02	6,00E-02
Woche10	1,89E-01	2,96E-01	7,31E-01	1,10E-02	9,36E-02	4,47E-01	5,87E-03	8,11E-01	3,17E-02	1,24E-01

Tab.21: p-Werte für die Abb. 33

p-Werte	Gr. 1 vs. 2	Gr. 1 vs. 3	Gr. 1 vs. 4	Gr. 2 vs. 3	Gr. 2 vs. 4	Gr. 3 vs. 4
Monat 1	3,14E-03	3,23E-01	3,01E-03	6,24E-04	1,84E-01	7,25E-04
Monat 2	4,11E-04	1,52E-02	7,68E-04	5,34E-03	4,43E-01	5,48E-03
Monat 3	4,56E-03	1,41E-01	1,29E-03	8,98E-02	2,81E-01	8,62E-02

Tab.22: p-Werte für die Abb. 34-35

p-Werte	Gr. 1 vs. 2	Gr. 1 vs. 3	Gr. 1 vs. 4	Gr. 1 vs. 5	Gr. 1 vs. 6	Gr. 2 vs. 3	Gr. 2 vs. 4	Gr. 2 vs. 5	Gr. 2 vs. 6
Tag 4	1,22E-01	4,53E-01	6,93E-01	1,36E-03	2,13E-01	3,27E-02	2,43E-01	6,33E-02	7,67E-01
Tag 8	7,61E-01	1,34E-01	5,31E-01	4,79E-02	2,98E-01	4,25E-02	3,21E-01	2,31E-02	4,00E-01
Tag 12	1,35E-02	5,71E-01	1,74E-01	4,81E-01	2,56E-02	3,49E-02	2,70E-02	2,90E-02	1,57E-01
Tag 16	3,90E-03	1,74E-03	2,86E-03	6,61E-01	5,81E-04	2,50E-01	5,18E-01	1,08E-01	7,31E-01
Tag 20	3,58E-02	2,10E-01	3,63E-02	3,53E-02	3,76E-02	3,84E-01	6,77E-01	6,73E-01	3,54E-01
Tag 24	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
p-Werte	Gr. 3 vs. 4	Gr. 3 vs. 5	Gr. 3 vs. 6	Gr. 4 vs. 5	Gr. 4 vs. 6				
Tag 4	2,69E-01	2,53E-04	6,30E-02	4,36E-03	3,86E-01				
Tag 8	3,69E-01	1,65E-01	1,30E-02	1,00E-01	1,02E-01				
Tag 12	5,66E-01	9,38E-01	1,07E-01	5,71E-01	5,36E-02				
Tag 16	5,26E-01	1,86E-01	1,56E-01	1,47E-01	5,95E-01				
Tag 20	3,94E-01	3,66E-01	4,15E-01	5,06E-01	3,93E-01				
Tag 24	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN				

Tab.23: p-Werte für die Abb.36

p-Werte	Gr. 1 vs. 2	Gr. 1 vs. 3	Gr. 1 vs. 4	Gr. 1 vs. 5	Gr. 1 vs. 6	Gr. 2 vs. 3	Gr. 2 vs. 4	Gr. 2 vs. 5	Gr. 2 vs. 6
Tag 4	4,33E-01	1,69E-01	2,87E-01	3,85E-01	6,19E-01	8,71E-02	3,20E-01	7,54E-01	5,13E-01
Tag 8	6,44E-01	7,35E-05	7,05E-04	5,49E-02	5,18E-03	1,09E-03	1,20E-02	5,07E-02	4,53E-02
Tag 12	3,65E-01	1,12E-03	2,64E-01	2,59E-02	9,59E-01	4,77E-05	4,68E-02	7,09E-05	1,38E-02
Tag 16	1,67E-03	6,61E-01	4,93E-03	9,35E-01	1,18E-03	3,98E-04	6,35E-01	3,11E-02	1,57E-01
Tag 20	1,56E-02	6,61E-01	1,90E-02	6,16E-01	5,72E-02	7,50E-02	9,44E-01	3,14E-03	7,50E-03
Tag 24	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
p-Werte	Gr. 3 vs. 4	Gr. 3 vs. 5	Gr. 3 vs. 6	Gr. 4 vs. 5	Gr. 4 vs. 6				
Tag 4	3,16E-01	1,04E-01	5,25E-02	4,15E-01	1,07E-01				
Tag 8	4,35E-02	4,50E-04	1,77E-02	1,87E-03	4,28E-01				
Tag 12	4,04E-05	3,34E-03	1,37E-04	5,09E-05	5,26E-03				
Tag 16	3,32E-03	8,10E-01	5,55E-06	3,15E-02	2,19E-01				
Tag 20	7,80E-02	8,14E-01	2,96E-01	7,37E-03	2,07E-02				
Tag 24	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN				

Tab.24: p-Werte für die Abb. 37

p-Werte	Gr. 1 vs. 2	Gr. 1 vs. 3	Gr. 1 vs. 4	Gr. 1 vs. 5	Gr. 1 vs. 6	Gr. 2 vs. 3	Gr. 2 vs. 4	Gr. 2 vs. 5	Gr. 2 vs. 6
Tag 4	1,68E-02	4,07E-04	4,35E-03	1,57E-01	5,26E-02	7,30E-02	1,46E-01	8,79E-01	6,92E-04
Tag 8	1,58E-02	6,33E-03	7,17E-02	1,62E-04	8,72E-03	9,91E-01	2,13E-01	2,27E-04	2,04E-01
Tag 12	9,11E-03	7,97E-05	5,12E-04	2,94E-01	4,54E-04	2,49E-01	3,42E-01	1,71E-02	2,62E-01
Tag 16	3,58E-02	2,46E-06	2,13E-02	9,55E-02	3,68E-02	3,19E-07	1,62E-03	4,43E-01	4,75E-04
Tag 20	1,09E-01	9,90E-01	1,05E-01	2,96E-01	1,31E-01	1,21E-01	7,18E-01	4,69E-02	2,68E-01
Tag 24	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
p-Werte	Gr. 3 vs. 4	Gr. 3 vs. 5	Gr. 3 vs. 6	Gr. 4 vs. 5	Gr. 4 vs. 6				
Tag 4	9,16E-01	1,80E-01	2,48E-05	2,17E-01	5,77E-04				
Tag 8	1,65E-01	6,95E-05	1,85E-01	3,93E-04	3,70E-02				
Tag 12	8,77E-01	4,05E-05	8,13E-01	6,11E-04	7,74E-01				
Tag 16	1,81E-06	1,10E-04	1,04E-07	1,32E-02	1,56E-01				
Tag 20	1,16E-01	3,15E-01	1,45E-01	6,05E-02	2,93E-01				
Tag 24	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN				

Tab.25: p-Werte für die Abb. 38, 39 a und b

p-Werte	Gr. 1 vs. 2	Gr. 1 vs. 3	Gr. 1 vs. 4	Gr. 1 vs. 5	Gr. 1 vs. 6	Gr. 2 vs. 3	Gr. 2 vs. 4	Gr. 2 vs. 5	Gr. 2 vs. 6
Tag 4	7,15E-02	1,49E-10	8,42E-11	1,82E-02	3,41E-04	1,53E-07	1,39E-07	4,65E-03	1,23E-03
Tag 8	6,75E-01	3,05E-06	3,05E-06	1,26E-02	1,86E-01	2,78E-08	2,78E-08	3,33E-04	2,97E-02
Tag 12	1,72E-01	3,39E-09	3,41E-08	2,42E-04	1,95E-03	5,24E-08	3,93E-07	1,93E-04	8,19E-04
Tag 16	8,89E-09	4,86E-09	4,06E-10	5,06E-08	1,74E-09	4,29E-07	6,26E-08	1,30E-05	2,77E-04
Tag 20	1,60E-11	3,70E-15	2,74E-15	3,51E-12	2,67E-13	1,95E-12	1,13E-12	2,88E-07	9,77E-08
Tag 24	8,66E-06	1,62E-11	2,39E-16	8,86E-16	3,68E-01	1,82E-10	3,39E-11	4,52E-11	6,63E-04
p-Werte	Gr. 3 vs. 4	Gr. 3 vs. 5	Gr. 3 vs. 6						
Tag 4	9,26E-01	4,65E-07	4,37E-11						
Tag 8	NaN	1,39E-11	8,59E-08						
Tag 12	8,95E-01	5,19E-08	2,07E-07						
Tag 16	9,06E-02	1,53E-10	1,92E-09						
Tag 20	2,99E-04	8,56E-08	3,64E-12						
Tag 24	8,41E-11	2,15E-10	9,42E-05						

Verzeichnis der akademischen Lehre

Meine Akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Aumüller	Grzeschik	Maier	Schmidt
Basler	Hasilik	Maisch	Schofer
Bahr	Hellwig	Mittag	Seitz
Barth	Hofmann	Moll	Sekundo
Bartsch	Höffken	Moosdorf	Sesterhenn
Baum	Hoyer	Müller	Sommer
Becker	Karakas	Mueller	Steininger
Berger	Kessler	Oertel	Stief
Bien	Kill	Pagenstecher	Teymootarsh
Bette	Klingmüller	Pfützner	Vogelmeier
Cetin	Klose	Plant	Wagner
Czubayko	König	Preisig-Müller	Werner
Daut	Köster	Rausch	Wilke
Del Rey	Koolmann	Renz	Weihe
Duda	Kühne	Richter	Westermann
Eberhardt	Lill	Röhm	Wulf
Fuchs-Winkelmann	Liss	Roeper	Vogt
Funk	Lohoff	Rothmund	Zemlin
Geks	Löffler	Ruchholtz	Zettl
Görg	Luers	Schäfer	Zovko

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst dem Direktor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz für die hervorragende Unterstützung und Mitgestaltung des Arbeitsprojekts sowie für die sehr freundliche und herzliche Aufnahme in die Reihen der Unfallchirurgen während der gesamten Zeit. Die gemeinsamen Trainings und Rennen mit dem Drachenboot auf der Lahn bleiben in stets guter und schöner Erinnerung.

Des Weiteren danke ich besonders meinem Doktorvater Oberarzt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas M. Frangen für die Hilfestellungen und Korrekturen während der Erstellung meiner Dissertation. Und dies, obwohl erst später zu der Arbeitsgruppe hinzugestoßen, zeugt seine Unterstützung von einer gewissen Selbstlosigkeit und Einsatzbereitschaft im Sinne der Vollendung begonnener Promotionen.

Aber auch ein besonderer Dank gilt dem Oberarzt Herrn Dr. med. Ewgeni Ziring, der mich in den letzten 4 Jahren während der Planung und Durchführung dieser Arbeit begleitet hat. Ohne den ständigen Austausch untereinander und den konstruktiven Gesprächen wäre solch eine experimentelle Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch herzlich bei der leitenden Technischen Assistentin Frau Marita Kratz bedanken, der Seele des Labors, die meinen Kollegen Moritz Crönlein und mich in die Laborarbeit eingeführt hat und eine der Hauptpersonen für den Aufbau und die Vollendung dieses Projekts war. Ihrer Erfahrung und ständigen Hilfestellungen haben das gesamte Team und ich es zu verdanken, dass solche Projekte von der Theorie in die Praxis umgesetzt werden konnten.

Auch möchte ich herzlich dem Technischen Assistenten Toh-Weng Tan danken, der, obwohl zu den experimentellen Orthopäden zugehörig, uns trotzdem mit Rat und Tat zur Seite stand und uns viele theoretische und praktische Tipps mit an die Hand gab.

Ich danke der Firma Stryker für die Bereitstellung des BMP-7, denn ohne diesen spendablen externen Förderer wäre dieses Projekt niemals möglich gewesen.

Meinem Mitdoktoranden und gutem Freund Moritz Crönlein gilt ebenfalls ein besonderer Dank. Ohne ihn und seinem Durchsetzungswillen wären wir sicher nicht so schnell mit dem praktischen Teil dieser Arbeit fertig geworden. Und ohne mich hätte er sicher irgendwann den schwerwiegenden Fehler begangen, nach Ablauf einer weiteren „Deadline“, die Arbeitsgruppe zu verlassen. Zum Glück hat er dies nicht getan, denn seit Juli 2012 darf er sich mit Dr. med. anreden lassen. Die zahllosen Stunden des Wartens, des Planens, des Umänderns, die gemeinsamen unzähligen Stunden im Labor und in unserem „U-Boot“ werde ich nie vergessen.

„Hinten oben zehn!“

Auch kurz in Erwähnung bringen möchte ich unseren Kollegen und guten Freund Fabian Beigelböck, der uns immer wieder empfohlen hat, an „unserem Baby“ festzuhalten. Vielen Dank dafür.

Ebenso möchte ich meiner lieben Freundin Karina Jasinski danken, für Ihre unbeschreibliche ruhige Art und die Unterstützung die sie mir während des letzten Abschnittes dieser Arbeit hat zu kommen lassen. Sie hat mir stets die Harmonie gegeben, die ich gebraucht habe.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken Ute und Reinhard Ambrock. Sie haben mir all dies hier erst möglich gemacht. Vielen Dank für die vielen Ratschläge und Durchhalteparolen sowie auch für die finanzielle Unterstützung. Diese Arbeit ist Ihnen gewidmet und auch meinen Großeltern, die leider nicht mehr unter uns weilen.